АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV. ВЫП. 3

220 лет
АКАДЕМИИ НАУК СССР

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,

Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,

Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imschenecki,

B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,

V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,

W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

МИКРОБИОЛОГИЯ В АКАДЕМИИ НАУК СССР

Б. Л. Исаченко

Мир низших организмов со времен изобретения микроскопа интересовал ученых и привлекал их внимание к его исследованию, но приступить к изучению его было нелегко. Микроскоп не получил еще распространения в университетских лабораториях, как рассказывает об этом Тимирязев, а в кружке академиков, куда вошел молодой Ценковский и где были такие знаменитости, как К. Бер, Брандт, Гельмерсен, Ленц, Якобия, Струве, только «бредили микроскопом, наслаждались удачными препаратами, что им не всегда удавалось». Изучение мельчайших существ подвигалось поэтому медленно, и еще в восьмидесятых годах прошлого столетия привезенный из-за границы в Петербургский университет автоклав внушал уважение и опасение, а объяснения пользования им (1891 г.) ассистент производил, не сводя глаз с книги.

Первая микробиологическая лаборатория была организована в Петербурге в 1891 г. в Институте экспериментальной медицины (Виноградский); первая кафедра микробиологии появилась в университете в 1918 г. (Исаченко), а до того существовал (с 1900 г.) приват-доцентский курс; в Академии Наук микробиологическая лаборатория была организована в 1930 г.

Общая микробиолсгия сближается, с одной стороны, с физиологией и химией и ее отраслями, а с другой — с биологическими описательными науками, преимущественно с ботаникой.

Отсутствие в системе Академии микробиологической лаборатории сказалось в том, что главнейшие достижения русских ученых в области микробиологии были выполнены вне стен Академии Наук. Распространенный в широких кругах взгляд на микробиологию как на науку, имеющую задачей разработку вопросов медицинского характера, выразился в привлечении в состав открытой академической лаборатории микробиологов, составивших себе имя работами в области медицинской микробиологии. Однако развить этот раздел микробиологии можно было бы только при условии создания отдельной изолированной лаборатории, приспособленной для опытов с болезнетворными микроорганизмами и располагающей помещениями для опытных животных. Поэтому опыт соединения общей микробиологии с медицинской оказался неудачным, и вопросы медицинской микробиологии были своевременно (1937 г.) переданы в НКЗдрав. В свое время Виноградский указывал на различные задачи и затем методы, стоящие перед двумя важными отделами микробиологии: общей и медицинской.

В нашем очерке оказалось необходимым рассмотреть отдельно микробиологические работы, выполненные вне Академии ее сочленами и в организованном позже Институте микробиологии.

Ценковский Лев Семенович — член-корреспондент Академии Наук. Родился в Варшаве 1 октября 1822 г., умер в Лейпциге 25 сентября 1887 г. За работы, выполненные с 1873 по 1878 г., получил от Академии Наук Беровскую премию.

Его научная деятельность протекала главным образом в университетах в области ботаники, по изучению низших растительных и

животных организмов, что дало Геккелю право отметить его как первоклассного протистолога, а Ю. Сакс, имея в виду его бактериологические исследования, назвал Ценковского основателем научной бактериологии. Область низших организмов была в то время мало исследована и было трудно — «не впасть в целый ряд ошибок», как говорил Рейнгард на юбилее Ценковского. Немногочисленные ошибки были и у Ценковского, и он в них с прямотой истинного ученого сознавался. Так было, например, когда он, рассматривая появление крахмальной монады, заключил о существовании произвольного самозарождения (1856 г.). Изучая Rhizopoda, Myxomycetes и Flagellata, он заключил о существовании между ними близкого родства, исключающего какую бы то ни было грань между растительными и животными протистами. Перейдя к изучению одноклеточных водорослей, он описал пальмелевидное состояние, а приступив к изучению бактерий, пришел к выводу об их близости к водорослям и способности образовывать подобные же студенистые тела — «Zoogloea». Из нитей Cladothrix и Leptothrix получается, по его мнению: Torula, Bacillus, Bacterium Micrococcus, а поэтому все эти родовые названия применяются не к родам, а к стадиям полиморфных форм. Таким образом, в споре моно- и полиморфистов он встал на сторону последних. Последние годы своей жизни Ценковский посвятил изучению мускардины и сибирской язвы. Благодаря работам в этой, столь далекой от основной специальности области, ему удалось получить громадные количества вакцины и облегчить тем производство массовых прививок большим стадам овец. Преследуя в данном случае практические цели, он никогда не выпускал из виду теоретических вопросов. Появление слизистого вещества (клёк) на сахарных заводах, вызывающее порчу громадных количеств свекловичного сока, было им детально исследовано, причем причиной этой порчи оказался микроорганизм, названный им Ascoccus mesenterioides (Leuconostoc mesenterioides).

Ценковский был крупный ученый, оставивший после себя массу учеников, среди которых были два будущих академика — М. С. Воронин и А. С. Фаминцин. Из них первому принадлежит выяснение бактериальной природы организма, образующего клубеньки на корнях бобовых, а второй описал Newskia ramosa, бактериоподобный организм, образующий обильную слизь.

Виноградский Сергей Николаевич — член-корреспондент Академии Наук с 1894 г.; почетный член Всесоюзной Академии Наук с 1925 г. Родился в Киеве 1 сентября 1856 г.

Научная деятельность Виноградского сначала проходила в лаборатории физиологии растений Петербургского университета у проф. А. С. Фаминцына (впоследствии академика), затем в Ботанической лаборатории Страсбургского университета у проф. Де-Бари (1885—1888), после этого в Цюрихе в агрономической лаборатории Политехникума и в Гигиенической лаборатории (1888—1890).

В течение пребывания за границей Виноградский выполнил исследования о серо- и железобактериях, обнаружив существование группы микроорганизмов, у которых дыхательный акт заменен окислением неорганических соединений. К этой же группе организмов относятся исследованные им позже нитрифицирующие бактерии. Исследование процесса нитрификации, над которым без результата работали крупные европейские ученые, было также исчерпывающе разрешено Виноградским; метод (элективных культур, разработанный им), примененный им, был прост и остроумен, так что все это создало ему славу, и он оказался в первых рядах ученых с мировым именем. Открытие Виноградским у нитрифицирующих бактерий способности строить вещество своего тела из неорганических соединений при хемосинтезе, заменяю-

щем им фотосинтез зеленых растений, было признано крупнейшим приобретением в области физиологии. Блестящие исследования Виноградского обратили на него внимание, и он от Пастера получил приглашение в Париж, в Пастеровский институт, а из России — занять место заведующего отделом общей микробиологии в открывавшемся в Петербурге Институте экспериментальной медицины. Виноградский принял приглашение и переехал в Петербург. В Петербурге выполненные им исследования касались фиксации атмосферного азота свободно живущим в почве анаэробным Clostridium pasteurianum. Это был первый организм, открытый среди свободно живущих, усваивающих атмосферный азот. В Петербурге он пробыл до 1912 г., выйдя по болезни в отставку. Живя затем большую часть времени за границей, он работал в Пастеровском институте, причем научная деятельность его протекала с большой интенсивностью, и каждая новая работа, каждое его сообщение вызывало громадный интерес и появление многочисленных исследований. Виноградский по справедливости считается главным творцом почвенной микробиологии и, подобно Мечникову, гордостью русской науки. Он был выбран членом Королевского общества в Лондоне, членом Парижской и других главнейших академий.

Омелянский Василий Леонидович — член-корреспондент Академии Наук с 1916 г., действительный член Всесоюзной Академии Наук с 1923 г. Родился в Полтаве 23 февраля 1867 г.

Научная деятельность Омелянского проходила сначала в химической лаборатории Петербургского университета у проф. Меншуткина, а затем, в 1898 г., в отделе общей микробиологии Института экспериментальной медицины у Виноградского — ассистентом. После выхода Виноградского в отставку Омелянский занял место заведующего отделом общей микробиологии.

Кроме совместных работ с Виноградским над процессом нитрификации, Омелянский выполнил самостоятельные исследования по разложению клетчатки. В основу их был положен метод элективных культур, вполне себя оправдавший. Крайне запутанный вопрос был успешно разрешен им открытием двух специфических микробов-возбудителей брожения клетчатки, из которых один, разлагая клетчатку, образует метан, а другой — водород. Тщательно проведенное изучение биохимизма процесса обратило внимание ученых на молодого микробиолога. Вслед за этой работой появились другие, в которых на ярких примерах Омелянский доказывает свойственную микробам специфичность и приводит примеры необыкновенной чувствительности бактерий к минимальным количествам химических веществ; устанавливает присущее микроорганизмам разделение труда, выражающееся в последовательности вступления в процесс разложения вещества специфических микроорганизмов. Мастер слова, блестящий популяризатор,— он много сделал для распространения в широких кругах знаний о микроорганизмах, а его учебник «Основы микробиологии» является лучшим из всех существующих у нас и за границей.

Как Виноградский, так и Омелянский имели в своем распоряжении микробиологическую лабораторию в Институте экспериментальной медицины, где и выполняли свои экспериментальные работы, не поднимая вопроса об учреждении в составе Академии Наук специальной микробиологической лаборатории. Вопрос о ней возник лишь после смерти Омелянского, последовавшей 21 апреля 1928 г.

Буткевич Владимир Степанович — член-корреспондент Академии Наук СССР с 1929 г. (родился 20 июня 1872 г., умер 4 декабря 1942 г.). Научная деятельность Буткевича была посвящена преимущественно вопросам физиологии растений и биохимии и касалась образования кислот растительными организмами. Микробиологические работы носи-

ли характер экспедиционных исследований в Арктике во время плавания судна Морского института. Им выяснено наличие в морях истинных морских бактерий и занесенных с суши и ряд других важных вопросов.

Исаченко Борис Лаврентьевич — член-корреспондент Академии Наук СССР с 1929 г., действительный член Академии Наук УССР с 1945 г. Родился в Петербурге 14 июня 1871 г. По окончании университета работал за границей в Лейпциге (Пфеффер, Фишер), Галле (Абдергальден), Марбурге (Мейер), Дельфте (Бейеринк), Берне (Колле), в Париже (Пастеровский институт), на морских станциях и т. д.

Научная деятельность протекала главным образом в Главном ботаническом саду, где он работал по физиологии растений и по микробиологии (с 1897 г.). Им произведено исследование бактериальных процессов в арктических морях, впервые показано значение различных групп бактерий в круговороте элементов в морях. За монографию по этому вопросу Академия Наук СССР присудила (1918 г.) ему премию К. Бера. Дальнейшие работы его касались выяснения роли микроорганизмов в генезисе илов (лечебных грязей) в различных озерах высокой концентрации солей, в результате исследований появилась монография, переведенная за границей. Кроме того, работал по вопросам саморазогревания растительных веществ, по микроорганизмам нефти и т. д. (см. Институт микробиологии).

Институт микробиологии Академии Наук СССР возник в виде небольшой лаборатории в 1930 г. и с первых шагов деятельности поставил своей задачей разработку вопросов строения, развития и изменчивости микроорганизмов, преимущественно используя с этой целью дрожжи. Сравнительная простота организации микробов позволила развивать работы Института в направлении изучения: 1) изменчивости, наследственности и образования новых форм у микроорганизмов; 2) симбиоза между бактериями, грибами, дрожжами и ультравирусами; 3) природы ультравирусов. Главнейшие результаты работ этого периода (1930—1937 гг.), направленные в основном на критический разбор господствовавших в науке в тот период учений Лениса, Эндерлейна и др., ставивших под сомнение существование видовых различий у бактерий, показали, насколько несостоятельны получившие широкое распространение теории названных ученых (Бачинская, Красильников, Кудрявцев, Имшенецкий). Их исследования дали ясные доказательства существования у каждого вида микроорганизма своего цикла развития, причем никогда не наблюдалось той разнообразной смены форм, какая должна была бы быть по схемам Лениса и Эндерлейна. Полиморфизм, описанный немецкими учеными, является по существу формообразовательной реакцией клеток на условия культуры, не имея связи с циклом развития.

Изучение строения и развития микроорганизмов из группы лучистых грибков (Actinomycetales) (Красильников) показало, что многие организмы, которые определялись как «бактерии», а другие как «микрококки», должны быть отнесены к Actinomycetales, так как только на основании изучения изменчивости можно было выяснить их истинную природу. Имшенецкий показал, что некоторые микроорганизмы, считавшиеся за бактерий, по своему развитию и характеру роста должны быть отнесены к миксобактериям. Исследования строения развития и изменчивости бактерий (Раутенштейн, Кудрявцев) еще больше дали оснований утверждать, что современная классификация микроорганизмов нуждается в тщательной переработке и проверке описанных видов.

Большое внимание было обращено затем на исследования по изменчивости и образованию новых форм у микроорганизмов. Это генетическое направление работ прежде всего нашло отражение в работах

Филиппова над появлением у микроорганизмов наследственных изменений под влиянием лучей Рентгена и радия, ввиду же исключительного интереса выяснения общих законов изменчивости и наследственности в Институте была поставлена большая серия работ в этой области.

Дрожжи оказались удобным объектом, и в результате, под влиянием различных факторов, было получено большое количество рас, отличавшихся стойкими особенностями при отсутствии определенной направленности этого процесса, и установлена допущенная исследователями переоценка внешних признаков культуры, как признака отщепления новых рас. Исследования изменчивости дрожжей, актиномицетов, бактерий (Красильников, Крисс) дали обильный материал для установления этапов филогении микроорганизмов и влияния внешних факторов на изменение физиологических их свойств (Мейсель, Литвинов, Кондратьева, Красильников). Следствием изучения изменчивости в лаборатории явилась задача проверить ход ее у микроорганизмов в условиях естественной среды. Кудрявцевым сделаны выводы относительно потери дрожжами под влиянием внешних условий ферментативных свойств и о предполагаемом предке культурных дрожжей (Saccharomyces paradoxus). Имшенецкий проработал вопрос о ядре у бактерий, а Мейсель с помощью цитологического метода установил связь хондриома с клеточным дыханием.

Изучением явлений симбиоза и антагонизма микробов установлено распространение в почвах специфических бактерий, способных убивать различные паразитные грибы. Бактерии были названы миколитическими (Разницына, Кононенко, Худяков, Назарова и др.) и с успехом применены для предохранения растений от грибных паразитов (Новогрудский, Нахимовская, Худяков).

Работы по ультравирусам были начаты в конце 1935 г., и в первую очередь было подвергнуто изучению носительство вирусов (оспы и кори) с разнообразными дрожжевыми организмами, как имеющими значение для суждения об условиях существования ультравирусов во внешней среде и путях распространения вирусных заболеваний (Зильбер, Вострухова). При этом выяснилось наличие не только адсорбции вируса бактериями, но и гибели его под влиянием бактерий антагонистов (Гольдин). Одновременно с адсорбцией вируса наблюдалось изменение в клетках дрожжей. Изучение внутриклеточных включений при некоторых вирусных заболеваниях животных (инфекционная эктромелия, оспа птиц) показало (Туревич), что эти включения следует рассматривать как колонии мельчайших, так называемых «элементарных» вирусных телец, являющихся, повидимому, возбудителями заболевания.

Познанию природы ультравирусов растений были посвящены исследования Рыжкова и Неймана, сосредоточивших свое внимание на образующихся в клетках растений белковых кристаллах, обнаруженных американским исследователем Стенли.

В конце 1937 г. постановлением Президиума Академии Наук направление работ было несколько изменено в сторону развития физиологии и экологии микроорганизмов и разрешения вопросов, связанных с развитием промышленности и сельского хозяйства, а вопросы, имеющие близкое отношение к медицинской микробиологии, было решено исключить из тем, разрабатываемых в Институте Академии Наук, и передать группу сотрудников в Наркомздрав. Директором Института был назначен Б. Л. Исаченко, заведывавший в ВИЭМ отделом общей микробиологии. В образованный отдел бродильных организмов был назначен заведующим проф. Шапошников, который развернул исследования по ацетоноэтиловому и бутиловому брожению, установив тесную

связь с производственными организациями. В результате теоретических работ была установлена двухфазность ацетонового брожения, изучены микроорганизмы брожения как со стороны их морфологии, так и физиологии (Шапошников, Мантейфель, Иерусалимский), выявлены биологические причины, снижающие в производственных условиях выход ценных продуктов (Бехтерева и др.). В дальнейшем работы отдела (зав. Имшенецкий) пошли, с одной стороны, по использованию микроорганизмов в процессе получения лактатов из растительного сырья (Канунникова) и выяснению влияния на повышение выхода нужных продуктов различных факторов (витамины, гормоны и т. п.) (Иерусалимский, Неронова). Большое внимание обращено было на изучение термофилии, как присущей некоторым микроорганизмам способности, развиваясь при высокой температуре (60°), образовывать продукты, могущие быть использованными в производственных процессах. В результате был выработан бактериальный препарат (Имшенецкий) «супербиолаза», с успехом примененный при расшлихтовке тканей на заводах. Благоприятные результаты, полученные с применением термофильных организмов в производственных процессах, заставили обратить серьезное внимание (Имшенецкий) на эту группу микроорганизмов, мало, сравнительно, изученных с теоретической стороны и еще меньше со стороны использования их в промышленности. В отделе общей микробиологии (зав. Исаченко) было поставлено изучение процесса разрушения ароматических соединений термофильными бактериями. При этом выяснилось, что трудный процесс очистки заводских вод, содержащих фенолы, химическим путем может дать наилучшие результаты с последующим использованием специфических микроорганизмов, очищающих фенольные воды от последних следов этого соединения как в термофильных условиях, так и в мезофильных (Егорова, Кузнецов, Горюнова), что имеет большое теоретическое и практическое значение. Исследования Имшенецкого (совместно с Броцкой и Авдиевич) приводят к заключению о термофилии как об адаптации микроорганизмов к повышенным температурам. Исследования над процессом разрушения целлюлозы дали Имшенецкому и Солнцевой возможность осветить многие стороны процесса как относительно роли миксобактерий в ее разрушении, так и с биохимической стороны.

Отдел почвенных микроорганизмов развернул исследования в двух направлениях. С одной стороны, выяснялись те взаимоотношения, которые должны существовать между растением и микробами его ризосферы и носят характер взаимодействия. Красильников вместе с Кореняко разработали гипотезу, отводящую значительную роль фитогормональному воздействию микробов на растение. Гормоны могут иметь значение при применении бактериальных удобрений, дополняя или даже заменяя другие полезные свойства землеудобрительных препаратов. Проверка лабораторных исследований широко проводится в природных (полевых и огородных) условиях. Второе направление затрагивает существенный вопрос о структурообразовании различных почв. В результате работ, проведенных Мишустиным, выявилось, что главная роль в образовании почвенных структур принадлежит не бактериям, как это иногда принималось, но грибам и актиномицетам, обволакивающим и склеивающим почвенные агрегаты. Исследованию «вечной мерзлоты» посвящались работы Крисса над ее микрофлорой. По вопросам, связанным с генезисом нефтей, были получены интересные результаты. Так, при исследовании нефтей и сопровождающих их пластовых вод Баку были описаны (Исаченко) пурпурные серобактерии с глубин до 2 000 м, вероятнее всего реликтового происхождения, сохранившиеся вблизи нижней границы биосферы. Другая группа, повидимому, тоже реликтового происхождения, обнаружена (Штурм) в поро-

дах и водах нефтяных скважин Второго Баку. Эта группа бактерий обладает способностью восстанавливать сульфаты. Впервые было показано (Осницкая), что нафтеновые кислоты могут быть разрушаемы микроорганизмами и служить в то же время источником энергии для них. Постоянная консультация (Исаченко) микробиологических исследований, выполняемых в Баку сотрудниками местного нефтяного института (Малиянц, Рейнфельд), содействовала согласованию взглядов и давала направление работам. Оказана помощь при выяснении причины коррозии нефтепровода Баку — Батуми (Рейнфельд), вызываемой действием почвенных микроорганизмов. Помимо Института микробиологии, работы по микрофлоре нефтяных месторождений выполняли (Гинзбург-Карагичева) в Институте горючих ископаемых, при этом были получены интересные данные по распространению в нефти бактерий.

Вопрос о метаморфозе и миграции серы, породивший у геологов многочисленные гипотезы, получил обоснование в микробиологических исследованиях. Имеются все данные утверждать, что процессы, связанные с так называемым круговоротом серы, совершались в природе с древних геологических периодов в известной последовательности биогенных восстановительных и окислительных процессов. В результате этих процессов, совершавшихся в прибрежных мелководных лагунах или неглубоких морях, меняющих под влиянием тектонических явлений свой характер и положение, происходило биогенное выпадение серы, приводившее к образованию современных серных месторождений (Исаченко).

Исследования Мейселя, Одинцовой и Таусон над образованием микроорганизмами витаминов позволили им притти к определенным заключениям о роли дрожжей в синтезе витаминов группы В и дали возможность выработать схему получения витамина в культурах дрожжей в заводских условиях.

Исследования Шапошникова и Кудрявцева закладывают прочный фундамент (1942—1944 г.) под основы классификации бактерий и дрожжей на основании морфологических и физиологических признаков.

Природа ультравирусов не выходила из внимания Института и, как связанная с категорией веществ, совершенно новых для науки, приобрела особое значение, и вирусы, полученные в кристаллической форме, стали предметом изучения, как простейшая форма жизни, а белковое вещество, составляющее основу вируса, оказалось способным к саморепродукции (Рыжков). Большое внимание уделено оригинальным методам для решения этой трудной проблемы. Не меньше внимания уделено изучению активности вирусных белков и условиям передачи заразного начала насекомыми — передатчиками вирусов (Сухов и Вовк). Всесторонне изучены ими заболевания овса (закукливание), табака (мозаичная болезнь), помидор (столбур) и др.

Исследования Крисса связаны с изучением природы бактериофага и выпуском лечебных препаратов против дезинтерии, тифа и т. п.

В Институте почвоведения были выполнены исследования по экологии азотобактера (Сушкина).

Институт микробиологии выпустил ряд крупных монографий: Бургвиц — «Фитопатогенные бактерии», 1935 г.; Крисс — «Изменчивость актиномицетов», 1937 г.; Красильников — «Лучистые грибки и родственные им организмы», 1938 г.; «Определитель лучистых грибков», 1941 г.; Имшенецкий — «Строение бактерий», 1940 г.; «Микробиологические процессы при высоких температурах», 1945 г.; Рыжков — «Основы учения о вирусных болезнях растений», 1944 г.; Сухов — «Вирусы растений и насекомые-переносчики», 1942 г. и «Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними», 1941 г. При Институте (под редакцией Б. Л.

Исаченко) выходит единственный в Союзе журнал «Микробиология» (не медицинский).

Заключая наш очерк, мы видим, что русские микробиологи заняли выдающееся положение в рядах ученых других стран. Труды их не только дали толчок к появлению многочисленных исследований, но и способствовали развитию самостоятельных ныне наук, как почвоведение и биогеохимия.

Задачи микробиологии могут преследовать многообразные цели как для познания самих микроорганизмов, так и вызываемых ими процессов, используемых в различных производствах, а пользуясь выражением члена-корр. Акад. Наук Зюсса (Вена), можно сказать, что «лик земли» обязан своим теперешним состоянием во многом динамике микробиологических процессов, что выдвигает микробиологию в сферу наук, изучающих законы метаморфоза веществ и миграции элементов в земной коре.

Проблемы медицинской микробиологии не разрабатывались вообще в учреждениях Академии Наук, ими занимались многие медицинские высшие учебные заведения, бактериологические институты и лаборатории. Однако Академия Наук отметила избранием в члены-корреспонденты и почетные академики ряд выдающихся медиков-бактериологов [1].

Гордостью не только русской, но и мировой науки является член-корреспондент, а впоследствии почетный академик, нобелевский лауреат Ильия Ильич Мечников (1845—1916 г.), «поэт микробиологии», по выражению Ш. Николя. Будучи зоологом и патологом, Мечников после 20 лет своей научной деятельности отдает почти все свое внимание вопросам иммунитета и различным инфекциям. Мечникову принадлежит фагоцитарная теория иммунитета, сыгравшая огромную роль в развитии представлений об естественном и приобретенном иммунитете. Мечников оставил после себя огромное научное наследство и плеяду блестящих учеников — крупных русских ученых.

С выдающимся микробиологом, почетным академиком Николаем Федоровичем *Гамалея* (родился в 1859 г.) связан большой период в развитии отечественной медицинской микробиологии. И по сей день современник Пастера, Гамалея продолжает работать в целом ряде областей бактериологии и вирусологии. Труды Гамалея, стяжавшие ему славу крупного ученого, составляют около 300 названий, среди них немало монографических работ, выдержавших несколько изданий. Гамалея положил одним из первых начало в нашей стране антирабических прививок. Его заслугой является открытие птичьего вибриона. Еще в прошлом столетии Гамалея описал лизис сибиреязвенной палочки, впоследствии известный под названием явления бактериофагии. Значительное место занимают исследования Гамалея также в области чумы, холеры, туберкулеза, ряда вирусных заболеваний, иммунитета и т. д. В Академии Наук Гамалея руководил особой лабораторией изменчивости и эволюции микроорганизмов.

Русская эпидемиология начинает свою историю с исследований действительного члена Академии Наук СССР и Президента Украинской Академии Наук Даниила Кирилловича *Заболотного* (1866—1929 г.). Помимо многочисленных работ Заболотного по чуме, широко известны его экспериментальные исследования холеры, сифилиса, дифтерии, брюшного и сыпного тифов, малярии и т. п., в которых тесно сочетались эпидемиологические подходы с чисто бактериологическими установками при определении причин и условий распространения инфекций. Яркая научная деятельность Заболотного получила свое признание не только в России, но и далеко за пределами родины.

[1] Сведения составлены А. Е. Крисс.

Член-корреспондент Академии Наук Георгий Дмитриевич *Белоновский* (родился в 1875 г.) является крупным бактериологом. Перу Белоновского принадлежит большое количество работ, обобщающих плодотворные исследования автора в области чумы, брюшного тифа и ряда других инфекций. С именем Белоновского связано первое изучение в России эффективности брюшнотифозных прививок. Участник борьбы с эпидемиями холеры, сыпного тифа и др., Белоновский уделял и уделяет значительное внимание фундаментальным вопросам теории иммунитета.

ХИМИЗМ ФИКСАЦИИ АЗОТА АТМОСФЕРЫ АЗОТОБАКТЕРОМ

ВЛИЯНИЕ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ АЗОТФИКСАЦИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

М. В. Федоров

В предыдущем сообщении [2] нами приводились данные о влиянии структуры органического вещества на продуктивность азотфиксации. Для большинства исследованных веществ продуктивность азотфиксации оказалась строго пропорциональной запасу химической энергии в веществе и содержанию в нем углерода радикала (без углерода карбоксильной группы). На 1 ккал запаса химической энергии фиксировалось примерно 2 мг азота атмосферы, а на 1 г углерода радикала — от 20 до 25 мг. Исключение составили только спирты. На них продуктивность фиксации была значительно ниже. Единственной причиной подобной аномалии для спиртов могла быть только их поверхностная активность. Поэтому нам казалось целесообразным подвергнуть специальному исследованию влияние поверхностно-активных веществ на продуктивность азотфиксации на углеводах.

Как известно, еще Traube [8] было показано, что капиллярная активность у последовательных членов гомологического ряда увеличивается приблизительно в отношении $1 : 3 : 3^2 : 3^3$. Эта эмпирически установленная закономерность имеет значение и в биологических процессах. Весьма часто физиологическая активность органических веществ изменяется параллельно с их капиллярной активностью. Так, например, Fuhner [6] удалось показать, что для наркоза сердца лягушки требуются концентрации отдельных спиртов, точно соответствующие правилу Траубе. В нашем случае продуктивность азотфиксации на этиловом спирте была только в два раза выше, чем на пропиловом, но это несоответствие правилу Траубе может объясняться тем, что в культурах Az. agile имеет значение не поверхностное натяжение на границе с воздухом, а пограничное натяжение между протоплазмой и окружающей ее водной средой. А по отношению к пограничному натяжению известно, что в изокапиллярных растворах различных веществ оно может иметь неодинаковое значение. Для уточнения этих положений нами были поставлены опыты, в которых в качестве источника углерода использовался инвертный сахар в концентрации 0,1 моля (1,8 г на 100 мл среды), а в качестве поверхностно-активных веществ вносились изоамиловый, изобутиловый и изопропиловый спирты до концентрации 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 и 0,2 моля. В качестве минеральной среды служила наша модификация питательной среды для азотобактера. Среда разливалась в колбы Эрленмейера объемом в 300 мл по 100 мл и стерилизовалась в автоклаве при 0,75 атм. давления полчаса. Спирты вносились после стерилизации. Инфекция субстратов осуществлялась 1 мл суспензии азотобактера в стерильной водопроводной воде (налет с одной пробирки с косым агаром разбалтывался в 100 мл стерильной воды). Колбы выдерживались в термостате при температуре 25—30° в течение 30 дней. По окончании опыта в питательном растворе был определен остаточный сахар и проверена чистота культуры.

Во всех случаях культура оказалась чистой, но размеры клеток заметно варьировали при повышении концентрации спиртов. После этого в питательном субстрате был определен сахар (по Бертрану) и общий азот по Кьельдалю. Результаты анализов приведены в табл. 1. По ним можно судить о характере влияния наркотических веществ на продуктивность использования азотобактером сахара и продуктивность фиксации им азота атмосферы.

Таблица 1

Продуктивность фиксации азота атмосферы Az. agile в присутствии поверхностно-активных веществ

№ по порядку	Концентрация добавленного спирта в молях	Потребление сахара за время опыта в г	Потребление спирта за время опыта в г	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г сахара в отдельной культуре	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г сахара в среднем	Фиксировано азота атмосферы в мг: на 1 г-моль сахара	Продуктивность азотфиксации в % от контроля	Продуктивность дыхания в % от контроля	Концентрация спирта в молях, подавляющая дыхание на 50%	Концентрация спирта в молях, подавляющая азотфиксацию на 50%
				Изоамиловый спирт						
1	0,005	1,49 1,62	0,0 0,0	7,16 7,04	7,10	1 2780,0	95,3	86,4	—	—
2	0,010	1,36 1,66	0,0 0,0	4,73 3,89	4,31	775,8	57,8	83,9	—	—
3	0,050	0,90 0,95	0,0 0,0	4,09 3,71	3,90	702,0	52,3	51,4	> 0,050	> 0,050
4	0,100	0,64 0,72	0,0 0,0	0,61 0,83	0,72	129,6	9,6	37,9	—	—
5	0,200	0,20 0,55	0,0 0,0	0,28 0,25	0,27	48,6	3,6	15,3	—	—
				Изобутиловый спирт						
6	0,005	1,80 1,80	0,0 0,0	7,38 7,37	7,37	1 326,6	98,9	100,0	—	—
7	0,010	1,75 1,76	0,0 0,0	6,87 6,60	6,74	1 211,2	90,3	97,5	—	—
8	0,050	1,37 1,32	0,0 0,0	6,64 6,78	6,71	1 207,8	90,7	74,7	—	—
9	0,100	0,98 0,93	0,0 0,0	4,81 4,57	4,69	704,2	52,5	53,1	>0,100	>0,100
10	0,200	0,68 0,68	0,0 0,0	0,14 0,07	0,11	19,8	1,5	38,0	—	—
				Изопропиловый спирт						
11	0,100	1,75 1,75	0,0 0,0	7,00 7,40	7,20	1 296,0	97,7	97,3	—	—
12	0,200	1,45 1,45	0,0 0,0	4,92 4,11	4,52	813,6	60,6	80,6	—	> 0,200
13	0,300	0,90 0,90	0,0 0,0	2,20 1,95	2,07	372,6	27,6	50,0	0,300	—
				Контроль без добавления спирта						
14	—	1,80 1,80	0,0 0,0	7,14 7,14	7,44	1 340,2	100,0	100,0	—	—

Полученные результаты показывают, что по мере повышения концентрации спирта в среде падает как продуктивность азотфиксации, так и интенсивность дыхания. Если при концентрации изоамилового спирта в 0,005 моля продуктивность азотфиксации равна 95,3% от контроля, то при увеличении концентрации в 10 раз (0,05 моля) она отвечает только 52,3%, т. е. падает примерно в два раза. Почти в такой же мере падает и интенсивность дыхания. Из этого следует, что оба про-

цесса (азотфиксация и дыхание) совершаются в клетке на активных поверхностях. Поскольку количественный масштаб подавления этих процессов почти одинаков, следовало бы думать, что азотфиксация и дыхание тесно связаны между собой и, может быть, даже осуществляются на одной и той же каталитической поверхности. Однако ход этих процессов при более высоких дозах изоамилового спирта исключает такое предположение. Как можно видеть из приведенных цифр, при концентрации спирта в 0,100 и 0,200 моля дыхание остается на более высоком уровне, чем азотфиксация. Повидимому, последний процесс более чувствителен к поверхностно-активным веществам, чем дыхание. Поэтому становится неизбежным заключение, что азотфиксация совершается или на иной каталитической поверхности, чем окислительные процессы при дыхании, или на иных ее участках.

Совершенно такая же закономерность выявилась и в отношении изобутилового и изопропилового спиртов. Подавление азотфиксации на 52,5% для изобутилового спирта было обнаружено при концентрации в 0,100 моля (в два раза большей, чем для изоамилового спирта), а для изопропилового — при концентрации 0,200 моля (в два раза большей, чем для изобутилового спирта). Из этих данных следует, что при переходе от низшего члена гомологического ряда (пропилового спирта) к высшему для достижения одинакового эффекта требуется уменьшение концентрации в два раза. Полного подчинения правилу Траубе не получается, но закономерное убывание концентрации в два раза остается не подлежащим сомнению. Отношения концентраций для достижения одинакового эффекта выразятся следующими величинами (в тысячных долях моля): $200 : 100 : 50 = 2^2 : 2 : 1$ (пропиловый спирт : бутиловый спирт : амиловый спирт).

Еще более интересные результаты получились при дальнейшем повышении концентрации изобутилового и изопропилового спиртов. Так, например, при концентрации изобутилового спирта в 0,200 моля интенсивность дыхания равна еще 38% от контроля, а азотфиксация отвечает только 1,5%. То же самое получается и для изопропилового спирта. При концентрации в 0,300 моля дыхание соответствует 50% от контроля, а азотфиксация только 27,6%. Не остается никаких сомнений в том, что дыхание и азотфиксация, несмотря на кажущуюся взаимозависимость, являются процессами, осуществляющимися на разных каталитических поверхностях. На этом основании можно считать установленным, что гипотеза Blom [4], допускающая участие в азотфиксации той же каталитической поверхности с активным железом, какая определяет и окисление органического вещества в актах дыхания,— лишена основания. Каталитический аппарат азотфиксации и каталитический аппарат дыхания различны, поскольку они по-разному реагируют на введение в раствор поверхностно-активных веществ.

Разница в степени угнетения процесса азотфиксации одинаковыми концентрациями различных спиртов может обусловливаться двумя причинами: или 1) разной степенью их адсорбции каталитической поверхностью, участвующей в азотфиксации, или 2) разницей поверхности, занимаемой молекулами с разным поперечным сечением их. Еще Warburg [9] обратил внимание на то обстоятельство, что, несмотря на огромное различие между изонаркотическими концентрациями наркотиков в растворе, их количество, адсорбированное углем, оказывается во всех случаях довольно близким. Это позволило ему дать простое объяснение механизму наркоза при гетерогенном катализе. Суть дела, по его мнению, сводится к тому, что молекулы наркотика, адсорбируясь сплошным мономолекулярным слоем на поверхности катализатора, соответственно уменьшают его свободную поверхность, открытую для

реагирующих веществ. Так как произведение числа молекул наркотика на площадь, занимаемую каждой молекулой, должно быть величиной постоянной, то небольшие различия в числе адсорбированных молекул должны компенсироваться противоположным различием в размерах этих молекул. Если бы в нашем случае адсорбция различных спиртов осуществлялась в одинаковой мере, то степень угнетения процесса зависела бы только от различий в размерах молекул. Элементарные расчеты показывают, что этим дело не ограничивается. В самом деле: по формуле Коппа (Эггерт [3]) объемы молекул изопропилового ($CH_3CHOH\,CH_3$), изобутилового $\left(\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH\cdot CH_2OH\right)$ и изоамилового $\left(CH_3-CH_2-\begin{matrix}CH-CH_3\\|\\CH_2-OH\end{matrix}\right)$ спиртов будут отвечать следующим величинам:

1. Изопропиловый спирт: $(11{,}0\times 3)+(5{,}5\times 8)+7{,}8=84{,}8$ см³ (объем г-моля); 84,8 см³ : $6{,}06\times 10^{23}$ (число Авогадро) = 0,139 mμ³.
2. Изобутиловый спирт: $(11{,}0\times 4)+(5{,}5\times 10)+7{,}8=106{,}8$ см³ (объем г-моля); 106,8 см³ : $6{,}06\times 10^{23}=0{,}176$ mμ³.
3. Изоамиловый спирт: $(11{,}0\times 5)+(5{,}5\times 12)+7{,}8=128{,}8$ см³ (объем г-моля); 128,8 см³ : $6{,}06\times 10^{23}=0{,}211$ mμ³.

В указанные величины входят не только объемы самих молекул, но и промежутки между ними. Поэтому при дальнейших расчетах мы получаем не радиусы собственно молекул, а радиусы стояния молекул. Именно эта величина нам и будет нужна в дальнейшем для определения поверхности, занимаемой мономолекулярным слоем этих веществ, так как известно, что на поверхности они будут обращены радикалами наружу и, несмотря на удлиненные формы молекул, займут неодинаковую площадь. Расчет дает следующие величины:

1. Изопропиловый спирт: 0,139 mμ³ : $4/3\,\pi R^3=0{,}32$ mμ (R); $0{,}32$ mμ $\times$ $\times 0{,}32$ mμ $\times 3{,}14=0{,}322$ mμ².
2. Изобутиловый спирт: 0,17 mμ³ : $4/3\,\pi R=0{,}35$ mμ (R); $0{,}35$ mμ $\times 0{,}35$ mμ $\times 3{,}14=0{,}385$ mμ².
3. Изоамиловый спирт: 0,211 mμ³ : $4/3\,\pi R=0{,}38$ mμ (R); $0{,}38$ mμ $\times 0{,}38$ mμ $\times 3{,}14=0{,}453$ mμ².

Если бы эти спирты адсорбировались на каталитической поверхности, участвующей в азотфиксации, в одинаковой степени, то угнетение процесса было бы пропорционально площади поперечного сечения их молекул вместе с промежутками между ними и соответствовало бы отношению 0,322 : 0,385 : 0,453 = 1 : 1,2 : 1,40. А между тем анализы показывают, что они одинаково угнетают процесс азотфиксации при концентрации $2^2 : 2 : 1$. Из этого следует, что адсорбция этих спиртов каталитической поверхностью клетки, участвующей в азотфиксации, происходит не в одинаковой степени.

Учитывая разницу поверхности, занимаемой молекулами этих веществ, легко установить действительную степень адсорбции этих спиртов каталитической поверхностью, участвующей в азотфиксации. Она будет пропорциональна следующим величинам:

$$0{,}453 : (0{,}385\times 2) : (0{,}322\times 4) = 1 : 0{,}585 : 0{,}352.$$

изоамило-	изобутило-	изопропило-
вый спирт	вый спирт	вый спирт

Рассматривая эти цифры, нетрудно убедиться, что степень адсорбции этих спиртов почти пропорциональна их капиллярной активности.

Зная степень относительной адсорбции этих веществ и степень угнетения ими процесса азотфиксации при добавлении в питательную среду в одинаковых количествах, можно произвести примерный расчет каталитической поверхности, участвующей в азотфиксации. В самом деле, при повышении концентрации изоамилового спирта с 0,05 моля до 0,1 моля азотфиксация понижается с 52,3% до 9,6%, т. е. на 42,7%. При таком же повышении концентрации изобутилового спирта (с 0,05 моля до 0,1 моля) азотфиксация понижается с 90,7% до 62,5%, т. е. на 27,2%. Одинаковые дозы дополнительно введенного изобутилового и изоамилового спиртов дали разницу в угнетении процесса на 15,5%. Если принять, что молекулы 0,05 моля изобутилового спирта дали мономолекулярный слой на поверхности катализатора и блокировали на ней определенную площадь, то, принимая во внимание меньшую адсорбцию этого вещества по сравнению с изоамиловым спиртом (в 1,70 раза), мы должны были бы признать, что молекулы последнего только в том случае будут давать одинаковое угнетение процесса, если будут в 1,70 раза меньшей концентрации. Поверхности, занятые мономолекулярным слоем этих веществ, таковы: для изоамилового спирта $0{,}453\ m\mu^2 \cdot 0{,}303 \cdot 10^{23} = 0{,}1374 \cdot 10^{23}\ m\mu^2$ и для изобутилового спирта — $0{,}385\ m\mu^2 \cdot 0{,}303 \cdot 10^{23} = 0{,}1166 \cdot 10^{23}\ m\mu^2$. В силу большей адсорбции изоамилового спирта первую величину мы должны уменьшить в 1,70 раза. Только в этом случае можно ожидать одинакового эффекта от обоих спиртов. При введении этой поправки поверхность, занимаемая молекулами изоамилового спирта, дающими одинаковый эффект с молекулами 0,05 моля изобутилового спирта, должна отвечать — $0{,}1374 \cdot 10^{23}\ m\mu^2 : 1{,}70 = 0{,}081 \cdot 10^{23}\ m\mu^2$. На самом же деле в раствор добавлялось дополнительно 0,05 моля изоамилового спирта, мономолекулярный слой которого занимал поверхность, равную $0{,}1374 \cdot 10^{23}\ m\mu^2$. Она была значительно больше поверхности, занимавшейся дополнительно введенным количеством изобутилового спирта (0,05 моля), а потому и дала угнетение процесса на 12,5% больше, чем изобутиловый спирт. Из этого факта и следует существенный вывод: повидимому, дополнительное угнетение процесса на 12,5% обусловлено блокировкой излишней поверхности катализатора сильнее адсорбировавшимся изоамиловым спиртом, имеющим большие радиусы стояния молекул. Лишняя поверхность, занятая им по сравнению с поверхностью, занятой изобутиловым спиртом, равна: $0{,}137 \cdot 10^{23}\ m\mu^2 - 0{,}081 \times 10^{23}\ m\mu^2 = 0{,}056 \cdot 10^{23}\ m\mu^2$. Эта излишне блокированная поверхность в опыте с амиловым спиртом и понизила азотфиксацию на 12,5%. Поэтому вся поверхность катализатора, участвовавшего в азотфиксации в контрольном варианте опыта, должна отвечать примерно следующим величинам:

$$\frac{0{,}056 \cdot 10^{23}\ m\mu^2 \cdot 100}{15{,}5} = 0{,}365 \cdot 10^{23}\ m\mu^2 \quad \text{или} \quad 4{,}48 \cdot 10^4\ м^2\ (36\,500\ м^2).$$

Эта поверхность катализатора могла обеспечить фиксацию 14 мг азота атмосферы. Отсюда следует, что азотобактер для фиксации 1 мг азота атмосферы, повидимому, развивает каталитическую поверхность, отвечающую примерно 3 000 м².

Если принять радиус стояния молекул азота равным 0,122 mμ, то площадь их поперечного сечения будет соответствовать примерно 0,047 mμ². На поверхности в 3 200 м² может поместиться $6{,}81 \cdot 10^{20}$ молекул азота, а в 1 мг ассимилируемого азота содержится всего $0{,}22 \cdot 10^{20}$ молекул. Получается любопытный цифровой материал. Поверхность катализатора оказывается больше поверхности, занимаемой мономолекулярным слоем молекул ассимилируемого азота. Хотя этим расчетам мы не придаем абсолютного значения, однако принуждены сделать важное заключение для понимания механизма усвоения азота ат-

мосферы азотобактером. Оно сводится к тому, что активизация молекул азота, повидимому, достигается с большим трудом и только часть активированных молекул вступает в соединение с другими элементами и дает продукты азотфиксации. Вполне естественно поэтому полагать, что такой процесс, связанный с огромной каталитической или, вернее, структурной поверхностью клетки, очень трудно воспроизвести in vitro. И это положение вполне согласуется с фактами, приводившимися в литературе. Burk [5], Roberg [7] и другие исследователи не могли получить заметных количеств фиксированного азота при помощи клеточного сока азотобактера. Только Бах, Ермольева и Степаниан [1] наблюдали заметную фиксацию в клеточном соку азотобактера, но в свете наших данных такая возможность должна быть признана весьма затруднительной и данные указанных авторов требуют дополнительного подтверждения.

Если такие же расчеты провести применительно к одной живой клетке, а в контрольном варианте опыта мы имели $17 \cdot 10^{10}$ клеток азотобактера, то окажется,что каталитическая поверхность одной клетки будет соответствовать 36 500 м^2 : $17 \cdot 10^{10} = 2{,}6 \cdot 10^{10}$ mμ^2 = $2{,}6 \cdot 10^5$ μ^2 = = 260 000 μ^2. На этой поверхности могло бы поместиться $55 \cdot 10^{-9}$ молекул азота, а вес их отвечал бы примерно $0{,}56 \cdot 10^{-9}$ мг. По этому весу азота можно вычислить и вес живой клетки азотобактера. Если принять в ней 5% азота на сухой вес и 90% воды на живой вес, то одна клетка азотобактера должна весить $1{,}2 \cdot 10^{-7}$ мг. Эта величина почти точно отвечает действительному весу клетки азотобактера и подтверждает правильность наших расчетов. Кроме этого правильность расчетов легко подтвердить и сравнением эффективности воздействия изобутилового и изопропилового спиртов. В самом деле, при повышении концентрации изобутилового спирта от 0,1 до 0,2 моля продуктивность азотфиксации понижается с 62,5% до 1,5%, т. е. на 61%. При таком же повышении концентрации изопропилового спирта (с 0,1 до 0,2 моля) продуктивность азотфиксации падает с 98,7% до 60,6%, т. е. на 38,1%. Мономолекулярный слой 0,1 моля изопропилового спирта занял бы поверхность, равную 0,322 mμ$^2 \cdot 0{,}606 \cdot 10^{23} = 0{,}195 \cdot 10^{23}$ mμ^2. Мономолекулярный слой такого же количества изобутилового спирта соответственно имел бы площадь, равную 0,385 mμ$^2 \cdot 0{,}606 \cdot 10^{23} = 0{,}233 \cdot 10^{23}$ mμ^2. Но изобутиловый спирт адсорбируется в 1,67 раза больше, чем изопропиловый спирт (вычислено по концентрациям, дающим одинаковый эффект, с поправкой на размеры молекул). Поэтому фактическое количество этого спирта, способное дать такой же эффект, что и 0,1 моля изопропилового спирта, должно быть в 1,67 раза меньше. Внося эту поправку, мы получаем для изобутилового спирта следующую величину поверхности, равнозначную по активности 0,1 моля изопропилового спирта: $0{,}233 \cdot 10^{23}$ mμ^2 : 1,67 = $0{,}1398 \cdot 10^{23}$ mμ^2. Поскольку в опыте изобутиловый спирт добавлялся в концентрации 0,1 моля, то избыточная поверхность, занятая его молекулами, должна быть равна: $0{,}233 \cdot 10^{23}$ mμ^2— — $0{,}140 \times 10^{23}$ mμ^2 = $0{,}093 \cdot 10^{23}$ mμ^2. Эта излишне блокированная поверхность катализатора привела к понижению азотфиксации на 22,9%. Поэтому для полной блокировки всего катализатора, участвовавшего в азотфиксации в контрольном варианте опыта, понадобилась бы мономолекулярная поверхность, равная:

$$\frac{0{,}930 \cdot 10^{23}\ \text{mμ}^2 \cdot 100}{25{,}4} = 0{,}370 \cdot 10^{23}\ \text{mμ}^2$$

или же $3 \cdot 70 \cdot 10^4$ м^2 (41 800 м^2). Получается близкое совпадение с ранее рассчитанной величиной поверхности по подавлению азотфиксации одинаковыми дозами изоамилового и изобутилового спиртов. Такая идентичность результатов позволяет с еще большей уверенностью утверждать, что найденный нами новый прием оценки активной поверхности

участвующей в азотфиксации, повидимому, совершенно правилен. Он вероятно может быть использован не только для оценки активной поверхности, участвующей в азотфиксации, но и активной поверхности, участвующей в окислительных процессах при дыхании или при различных ферментативных процессах. Расчетные данные, доказывающие справедливость этого положения, будут приведены нами в следующем сообщении.

Абсолютные величины активной поверхности, несмотря на полное совпадение результатов с тремя различными спиртами, конечно, не являются вполне точными, так как поперечное сечение молекул нами вычислено по эмпирической формуле Коппа. Когда для этих соединений будут даны истинные размеры молекул и площадей их поперечного сечения, цифры могут получить уточнение. Для нас в данный момент важно отметить, что найден новый прием оценки активной поверхности, пока еще никем не применявшийся до сих пор. Этот новый прием, вероятно, будет иметь значительную сферу применения в биологии и позволит нам глубже проникнуть в механизм ряда биохимических процессов, до сих пор остающихся мало доступными для изучения.

В дополнительное подтверждение безусловной точности экспериментального материала, доказывающего наличие специальной каталитической поверхности, участвующей в азотфиксации, нами был поставлен еще один опыт с густыми суспензиями Az. agile. Опыт ставился в эрленмейеровских колбах объемом на 500 мл. В каждую колбу добавлялось 200 мл минеральной питательной среды с 3,6 г инвертного сахара. В каждую колбу после стерилизации было добавлено 10 мл суспензии азотобактера, содержавшей 1,7 г живых клеток этого организма. Титр клеток в исходной суспензии был равен $2{,}252 \cdot 10^9$. Опыт проводился при 30° С в течение 12 дней. Анализы дали следующие результаты:

Таблица 2

Влияние поверхностно-активных веществ на продуктивность азотфиксации в суспензии Az. agile

№ по порядку	Концентрация поверхностно-активных веществ в среде в молях	Потреблено сахара в г	Содержалось азота в суспензии в мг	Найдено азота после опыта в мг	Фиксировано азота атмосферы на 1 г сахара в мг	Продуктивность азотфиксации в %	Продуктивность дыхания в %	Количество клеток азотобактера после опыта
1	Контроль без спирта .	3,10	7,70	29,68	7,00	100,0	100,0	$6{,}2 \cdot 10^{10}$
		3,10	7,70	28,93				
2	Изопропиловый спирт							
	0,20	3,00	7,70	21,60	5,14	73,4	96,8	$3{,}41 \cdot 10^{10}$
		3,10	7,70	25,20				
	0,30	2,00	7,70	8,93	1,46	20,8	64,5	$2{,}83 \cdot 10^{10}$
		2,00	7,70	12,32				
3	Изобутиловый спирт							
	0,10	1,70	7,70	10,25	1,30	18,6	50,0	$5{,}47 \cdot 10^{10}$
		1,40	7,70	9,17				
	0,20	1,20	7,70	7,81	0,00	0,00	39,6	$2{,}13 \cdot 10^{10}$
		1,25	7,70	6,94				
4	Изоамиловый спирт							
	0,10	1,04	7,70	8,61	1,00	14,3	32,3	$1{,}67 \cdot 10^{10}$
		0,95	7,70	8,81				
	0,20	0,680	7,70	8,11	0,54	7,7	19,8	$0{,}67 \cdot 10^{10}$
		0,548	7,70	8,06				

Как можно видеть из приведенных цифр, ход процесса азотфиксации и процесса дыхания и при использовании в опыте заранее выращенных клеток азотобактера подчиняется установленной ранее закономерности. Дыхание клеток, несмотря на присутствие значительных количеств спирта в среде, продолжает еще оставаться на значительном уровне, не падающем ниже 20%, а азотфиксация в отдельных случаях почти полностью прекращается. При этом спирты с меньшим молекулярным весом подавляют процесс в меньшей степени, чем спирты с большим молекулярным весом. Концентрации использованных спиртов, дающие одинаковые степени понижения азотфиксации, выражаются теми же величинами, что и в предыдущем опыте: $1 : 2 : 2^2$, если итти от амилового спирта к пропиловому, или же $1 : 1/2 : 1/4$, если итти от пропилового спирта к амиловому. Это лишний свидетель бесспорной правильности экспериментально установленных фактов и лишнее подтверждение того, что процесс азотфиксации связан с активной поверхностью клетки, вероятно составляющей часть ее основной структуры. При таких значительных размерах активной поверхности, участвующей в азотфиксации, становится очевидным, что воспроизведение этого процесса in vitro встретится с большими затруднениями. Весьма возможно, что малая распространенность азотфиксирующей способности среди растительных организмов тоже связана с этими особенностями каталитического аппарата процесса.

Выводы

1. Азотфиксация в культурах Az. agile в присутствии поверхностно-активных веществ подчиняется определенной закономерности. При повышении концентрации спирта азотфиксация сначала падает, а затем и совсем прекращается. Дыхание же при этих концентрациях еще продолжает оставаться на значительном уровне (около 50% от контроля).

2. Для подавления азотфиксации на 50% требуются разные концентрации спиртов. Они правильно убывают при переходе от низшего члена гомологического ряда к высшему. Для изопропилового спирта эта концентрация равна 0,200 моля, для изобутилового спирта — 0,100 моля и для изоамилового спирта — 0,050 моля. Отношение концентрации соответствует $2^2 : 2 : 1$. Получается ряд, похожий на ряд Траубе, но с иным коэффициентом.

3. При высоких концентрациях спиртов (0,100—0,200 моля) дыхание еще продолжается со значительной интенсивностью (50% от контроля), а азотфиксация почти полностью прекращается. На этом основании можно утверждать, что каталитическая поверхность, участвующая в активации кислорода при дыхании и в активации азота при азотфиксации, не одна и та же. Поэтому гипотеза Блома, принимающая однотипность этой поверхности, должна быть признана лишенной основания.

4. Фактическая величина активной поверхности, участвующей в азотфиксации, точно определена по разности подавления азотфиксации одинаковыми количествами изопропилового и изобутилового спиртов. Она равна 36 500 м² на 14 мг фиксированного азота атмосферы или 3 200 м² на 1 мг азота. При учете числа клеток азотобактера получается $2{,}6 \cdot 10^5$ μ² на одну живую клетку. На этой поверхности в одной живой клетке можно было бы поместить $5{,}5 \cdot 10^{10}$ молекул азота, вес которых был бы равен $0{,}56 \cdot 10^{-9}$ мг. По этому количеству азота живой вес клеток азотобактера должен быть равен $1{,}0 \cdot 10^{-8}$ мг. Эта величина почти точно соответствует действительному весу живой клетки азотобактера и подтверждает правильность наших расчетов.

5. До сих пор, на основании исследований Варбурга, считалось что особенно чувствительны к наркотическим веществам два важных физиологических процесса: дыхание и ассимиляция углекислоты. На основании наших данных необходимо признать, что крайне чувствителен

к этим веществам еще один важный физиологический процесс: ассимиляция атмосферного азота азотобактером. Он значительно более чувствителен, чем дыхание, и, повидимому, более чувствителен, чем ассимиляция углекислоты.

6. Нам кажется, что сообщаемые здесь новые факты позволяют совсем по-новому подойти к расшифровке химизма азотфиксации и представляют значительный теоретический интерес.

Лаборатория физиологии растений и микробиологии Московской с.-х. академии им. К. А. Тимирязева

Получено 13.II.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Бах А., Ермольева З. и Степаниан М. Связывание атмосферного азота при обыкновенной температуре и давлении при посредстве энзимов, извлеченных из азотных бактерий. ДАН СССР, т. 1, вып. 1, стр. 22, 1934.
2. Федоров М. В. Продуктивность азотфиксации азотобактером на разных источниках углерода. Микробиология, т. XIV, вып. 2, стр. 94, 1945.
3. Эггерт Д. Н. Учебник физической химии, 1931.
4. Blom I. Hydroxylamin (NH_2OH) als Zwischenprodukt bei der Fixierung Atmosphär-Stickstoff. Biochem. Z., Bd. 134, S. 385, 1928.
5. Burk D. On the biochemical mechanism of nitrogen fixation by living forms. Biochem. J. (USSR), v. 11, p. 312, 1937.
6. Fuhner H. Die Wirkungsstärke der Narcotica, Biochem. Z., Bd. 120, S. 143, 1921.
7. Roberg M. Beiträge zur Biologie von Azotobacter. Jahrb. wiss, Botan., Bd. 82, S. 65, 1935.
8. Traube J. Über die Kapillaritätskonstanten organischer Stoffe in wässrigen Lösungen. Lieb. Ann., Bd. 265, S. 27, 1891.
9. Warburg O. und Negelein E. Ueber die Oxydation des Cystins und anderer Aminosäuren an Blutkohle. Biochem. Z., Bd. 113, S. 257, 1921.

ON THE CHEMICAL ASPECT OF THE FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN BY AZOTOBACTER. THE INFLUENCE OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES ON THE PRODUCTIVITY OF NITROGEN FIXATION

M. V. Fedorov

Summary

1. In the presence of surface-active substances nitrogen fixation in cultures of Azotobacter agile follows a definite law. If the concentration of alcohol in increased nitrogen fixation decreases at first and with its further rise stops entirely. Respiration, however, remains at these concentrations at a relatively high level (about 50 per cent of that in the controls).

2. Varying concentration of alcohols are needed to decrease suppressing nitrogen fixation by 50 per cent. They diminish regularly from the lower members of the homologous range upwards. For isopropylic alcohol this concentration is 0.200 of its mole, for isobutylic and isoamylic alcohols it is 0.100 and 0.050 of their respective moles. The ratio of the concentrations corresponds to $2^2:2:1$. A range resembling to the range of Traube but with a different coefficient is thus obtained.

3. At high concentrations of alcohols (0.100—0.200 mole) respiration continues at a considerable rate (50 per cent of the controls) while nitrogen fixation is almost completely stopped. For this reason it may be affirmed that the catalytic surface, participating in the activation of oxygen in respiration, and the one participating in the activation of nitrogen in the fixation of the latter are not one and the same. Therefore

the hypothesis of Blom which accepts the uniformity of this surface must be considered as unfounded.

4. The actual value of the active surface participating in the fixation of nitrogen has been exactly calculated from the difference in the suppression of nitrogen fixation by equal quantities of isobutylic and isoamylic alcohols. It equalizes 36500 m^2 on the 14 mg atmospheric nitrogen fixed or 3 000 m^2 per 1 mg of nitrogen. Taking into consideration the numbers of Azotobacter cells we obtain the value of 2.6×10^4 μ^2 per one live cell. $5{,}5 \times 10^{10}$ molecules of nitrogen, weighing 0.56×10^{-9} mg, could be placed on this surface in one live cell of Azotobacter. From this amount of nitrogen the live weight an Azotobacter cell may be calculated as equalizing 1.0×10^{-8} mg. This value almost exactly corresponds to the actual weight of a live Azotobacter cell, thus confirming the correctness of our calculations.

5. Up to the present it was considered on the ground of Warburg's investigations that two important physiological processes — respiration and assimilation of carbon dioxide—are particularly susceptible to the action of narcotic substances. Our results make it necessary to assume that one more important physiological process — the assimilation of atmospheric nitrogen by Azotobacter — is extremely susceptible to the action of these substances. It is much more susceptible to it than respiration and seems to be more susceptible that the assimilation of carbon dioxide as well.

6 It seems to us that the new facts reported in the present study permit a quite new approach to the understanding of the chemical aspect of nitrogen fixation and possess a considerable theoretical interest

Laboratory of Microbiology and
Plant Physiology of the
K. A. Timiriazev Academy of Agriculture,
Moscow

О «ДЫХАНИИ» МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

В. Н. Шапошников

Если в вопросах физиологии высших растительных и животных организмов ассимиляционные процессы занимают столь же почетное место, как диссимиляционные, то в области микробиологии внимание приковывается по преимуществу процессами деструктивного метаболизма.

Такое положение объясняется как разнообразием, так и размахом этих процессов, а также той ролью, которая им принадлежит в круговороте веществ в природе.

В противовес типичному дыханию высших органов, которое в своей основе представляется единообразным для всех представителей как животного, так и растительного мира, диссимиляционные процессы в мире микроорганизмов характеризуются большим разнообразием.

Наряду с окислительными процессами, происходящими за счет кислорода воздуха и приводящими к сжиганию углеводов до углекислоты и воды, мы встречаемся с ограниченным окислением, например спирта до уксусной кислоты. Наряду с окислением органических тел — с окислением сероводорода или аммиака; если нет доступа кислорода, то некоторые микроорганизмы оказываются способными осуществлять реакции окисления за счет восстановления $x NO_3$ или $x SO_4$ или же обходиться за счет тех процессов, которые получили название брожений.

Поскольку все эти процессы рассматриваются в качестве источников энергии для осуществления жизни, то за последнее время принято объединять их под понятием «дыхание», подразделяя его на дыхание аэробное и дыхание анаэробное.

Таким образом под дыханием чаще всего разумеют сумму тех сопровождающих жизнь организма энергетических процессов, которые являются источниками энергии для осуществления роста, с его биохимическими превращениями веществ, связанными с эндотермическими процессами конструктивного метаболизма, размножения, движения всего организма или его частей. Иногда, по отношению к высшим представителям животного и растительного миров, понятие «дыхание» более ограничительно определяется как окислительный распад сложных органических веществ, главным образом углеводов.

Но так как жизнь с ее разнообразными проявлениями не прекращается тотчас же после того, как прекращается доступ к живой материи кислорода, в особенности в случае растительного организма, то отсюда делается вывод о возможности существования за счет бескислородного (или по старой терминологии — «интрамолекулярного») дыхания. Такому пониманию особенно способствовало то, что начальные стадии процессов анаэробного гликолиза, например при спиртовом брожении, оказались общими с процессами гликолиза при дыхании.

Однако расширительное применение терминов вряд ли удобно. Действительно, если в спиртовом или молочнокислом сбраживании углеводов и в дыхании растений или дрожжей можно находить некоторые общие моменты как с точки зрения характера используемого материала, так и направления начальных стадий биохимических превращений веществ, то окисление глюкозы в глюконовую и последней в 5-кетоглюконовую кислоту уксуснокислыми бактериями лишь с большой на-

тяжкой может отождествляться с дыханием высшего растения. Но по крайней мере общим в данном случае является материал (углеводы), подвергающийся окислению. Еще труднее, конечно, под одним термином понимать и дыхание высшего растения и окисление сероводорода до серы, в особенности если иметь в виду процесс, осуществляемый пурпурными бактериями на свету.

Эти и ряд других соображений заставляют нас отказаться от расширительного толкования термина «дыхание». Поэтому мы под этим названием будем разуметь только окислительные процессы, разыгрывающиеся за счет кислорода воздуха на углеводах или продуктах их расщепления и связанных с гликолизом.

Значительный интерес приобретает обсуждение тех появившихся за последнее время данных, которые как будто свидетельствуют о наличии способности к дыханию у тех бактерий, которые известны как анаэробные. Мы имеем в виду пропионовокислые (Fromageot) и молочнокислые (Davis) бактерии.

Указания на способность к дыханию за счет кислорода представителей этих групп микроорганизмов становятся тем более интересными, что в микробиологии принято считать, что они способны существовать за счет брожения, которое со времени Пастера принято определять как жизнь «без кислорода», а некоторые из них (Thermobact. cereale, пропионовые бактерии) обычно лучше удаются в культуре при так называемых анаэробных условиях.

Возможность параллельного осуществления микроорганизмами и дыхания и анаэробного брожения, являющаяся в сущности отражением идей о взаимосвязи этих процессов, развивавшихся в свое время Пфлюгером, отмечается разными авторами (ср. Стоклаза по отношению к дрожжам). Эту же мысль мы находим и у Эммерлинга [11a] по отношению к молочнокислым бактериям. Говоря о молочнокислом брожении, названный автор прибавляет (стр. 34):

«То обстоятельство, что при каждом брожении образуются побочные продукты, в особенности углекислота, вовсе не удивительно, так как естественно часть сахара сжигается бактериями в процессе дыхания».

Можно думать, что в иных случаях для осуществления различных проявлений жизни организм может пользоваться различными источниками энергии. Так, основным источником энергии при фотосинтезе зеленых растений, как известно, является лучистая энергия. Но она используется, повидимому, только в процессе углеродного питания — синтеза углеводов, т. е. распространяется только на часть процессов, связанных с конструктивным метаболизмом. Параллельно с этим растение пользуется, как известно, дыханием как основным энергетическим процессом, связанным с ростом, размножением и т. д.

Можно поэтому допустить, что те основные биохимические превращения веществ, которые осуществляются микроорганизмами и которыми часто пользуются для установления физиологических группировок, как молочнокислое брожение или нитрификация, являются лишь частью энергетических процессов данных организмов, обеспечивающих не все потребности их жизни, и что наряду с ними имеются ускользающие в обычных условиях культуры от внимания процессы, которые имеют также энергетический характер и необходимы для жизни. Такая точка зрения вполне допустима, тем более, что всегда следует помнить о том, что все процессы, сопровождающие жизнь, настолько тесно связаны и переплетены, что иногда трудно четко решить, где кончаются процессы конструктивного метаболизма и где начинаются энергетические реакции (например образование изоамилового спирта из лейцина).

В работе Bömke [9] с нитрификаторами выставляется положение о том, что обычное понимание нитрификации как дыхания следует считать несостоятельным. Основание для этого автор видит в том, что

«в сильно обогащенной чистой культуре, особенно нитробактера, после конца нитрификации можно обнаружить при помощи дифференциального манометра еще дальнейшее поглощение O_2. Это явление указывает на наличие в клетках нитрификаторов диссимиляционного процесса, имеющего смысл дыхания» (стр. 743).

Решение вопроса о существовании параллельно с бродильными процессами также и дыхательных функций имеет большое теоретическое значение с точки зрения ориентировки в еще незаглохшем споре варбурговского и виландовского направлений в понимании сущности реакций при окислительных и бродильных процессах. Но этот же вопрос приобретает и большое практическое значение по линии попыток направления биохимической деятельности микроорганизмов в желаемую сторону. Решение его может внести некоторую ясность и в определение ценности физиологических признаков в вопросах филогении при попытках использовать характер биохимической деятельности для построения физиологической систематики (ср. Шапошников [5]).

Особое значение вопрос о дыхании приобрел после работ Bertho и Ghück [8] и Davis [11] с гомоферментативными молочнокислыми бактериями, поскольку сам по себе процесс молочнокислого брожения (независимо от отношения бактерий к кислороду) является анаэробным, протекающим вне всякого участия в нем кислорода воздуха, как то следует из формулы молочнокислого брожения.

Для решения вопросов о путях превращения веществ при брожениях (и других биохимических процессах) пользуются различными методами: 1) попытками нахождения или улавливания промежуточных продуктов в субстрате; 2) введением предполагаемых промежуточных продуктов в субстрат с тем, чтобы проследить их судьбу, и 3) изучением тех реакций, которые могут быть осуществлены ферментными системами организмов.

В настоящее время последний путь исследования особенно привлекает исследовательскую мысль и в области молочнокислого брожения мы имеем в этом направлении большое количество весьма интересных данных, толкование которых, однако, далеко не так просто, как это иногда представляется.

К сожалению, однако, на основании данных этих исследований микробиологами делаются нередко заключения, идущие значительно дальше тех возможностей, которые вытекают из критической оценки фактов. Именно с таким положением мы встречаемся в работе Davis [11], посвященной вопросу о дыхании молочнокислых бактерий.

Работа Дэвис касается прежде всего представителя гомоферментативного молочнокислого брожения Bact. Delbrückii, который по номенклатуре О. Иенсена должен носить название Thermobact. cereale.

Попутно следует отметить, насколько осторожным следует быть при микробиологических работах в отношении номенклатуры и использования штаммов, полученных от других лиц и учреждений. Дэвис указывает, что им были получены под названием Bact. Delbrückii культуры из двух институтов — Inst. für Gärungsgewerbe в Берлине и Института молочного хозяйства из Киля (от Геннеберга). При проведении исследований с ними они оказались физиологически настолько различными, что второй из них был переименован автором в Bact. cereale (?), причем автор считает его сходным с описанным О. Иенсеном Betalacterium (?).

Напомню, что с совершенно аналогичным положением встретились в свое время Hermann и Neuschul [13], когда они из тех же институтов получили культуры под названием Bact. aceti. Однако на основании своих работ с этими культурами они вынуждены были отнести

одну культуру в группу кетогенных, другую в группу акетогенных уксуснокислых бактерий.

Помещая отмытые от субстрата тела бактерий в раствор лактата Na, Дэвис в аппарате Варбурга наблюдал энергичное поглощение кислорода и окисление молочной кислоты, каковой процесс он и считает дыханием, устанавливая для Bact. Delbrückii дыхательный коэффициент ($\frac{CO_2}{O_2}$) в пределах от 0,5 до 0,9.

Молочнокислые бактерии, по Дэвису, оказываются наделенными тремя энергетическими возможностями: дыханием, окислительным брожением и молочнокислым брожением. Bact. Delbrückii обладает способностью к анаэробному гликолизу (молочнокислому брожению) и дыханию, которое «в конечном счете должно сводиться к окислению лактата» (ср. стр. 104). В случае Bact. cereale к этим двум процессам присоединяется еще окисление молочной кислоты до пировиноградной с дальнейшим карбоксилатическим расщеплением последней до уксусного альдегида и углекислоты. Это окисление автор склонен рассматривать как окислительное брожение.

Эти опыты Дэвис не стоят особняком. Еще раньше Берто и Глюк указывали на способность Bact. Delbrückii к дыханию на основании опытов с суспензиями бактерий; Fromageot и Roux получили тот же эффект с суспензиями Bact. bulgaricum; Chaix и Fromageot [10] с суспензиями пропионовокислых бактерий.

Способность ферментных систем молочнокислых и некоторых других близких к ним бактерий к окислению молочной кислоты и других веществ была обнаружена при работе с ферментными системами в опытах также ряда других исследователей.

Автору этих строк на протяжении длинного ряда лет пришлось интересоваться молочнокислым брожением (ср. Шапошников и Мантейфель, 1923, Шапошников и Захаров, 1929). Однако многочисленные наши опыты как раз с Bact. Delbrückii (Thermobact. cereale) не показывали никакой тенденции названного организма к дыханию и, больше того, все данные (ср. также Henneberg [12]) указывали на лучшее развитие ее в отсутствии доступа воздуха. Поэтому опыты Дэвиса не могли не привлечь внимания с точки зрения их толкования.

Нужно сказать, что правильность сообщаемых Дэвисом фактов не вызывает никаких сомнений, так как повторение его опытов, проведенное нами, показало, что суспензия Thermobact. cereale действительно очень быстро превращает соли молочной кислоты в углекислые, что сразу обнаруживается как резким смещением pH в щелочную сторону, так и аналитическими данными.

Однако нормальная культура Thermobact. cereale не показывает склонности к осуществлению при своем развитии тех окислительных реакций, которые Дэвисом устанавливаются для ферментных препаратов этих бактерий.

Дело в том, что изучение хода кислотообразования в культуре Thermobact. cereale и других представителей гомоферментативного молочнокислого брожения всегда обнаруживает совершенно один и тот же характер кривых, показывающих вначале энергичное, затем постепенно замедляющееся кислотонакопление, рано или поздно останавливающееся, но никогда у этих бактерий не обнаруживающее снижения, как бы долго опыт ни продолжался (ср. данные Шапошникова и Мантейфель [6], Чекан [3], Мантейфель и Дратвиной [2] и ряд других).

К сказанному следует добавить, что прямые определения выходов молочной кислоты в культурах Thermobact. cereale показывают (ср. Дульман [1], а также приводимые ниже экспериментальные данные в табл. 1), что выходы молочной кислоты достигают величин,

близких к 100% от потребленного сахара. При этом никакого образования CO_2 никем из исследователей не обнаружено (ср. Henneberg). Наконец, прямые опыты показывают, что темп кислотонакопления в культурах всегда совпадает с темпом размножения бактерий (ср. O. Jensen).

Таким образом то энергичное окисление молочной кислоты, которое наблюдал Дэвис в опытах с суспензией бактерий и которое он склонен рассматривать как дыхательный процесс, упорно не обнаруживается в нормально развивающихся культурах.

Возникает поэтому вопрос, имеем ли мы право то явление, которое наблюдал Дэвис, и в реальности которого при его постановке опытов нет сомнений, рассматривать, как дыхание.

Совершенно очевидно, что в указанной постановке опыта мы имеем дело с окислением молочной кислоты кислородом воздуха. Таким образом очевидно, что при этом обнаруживается способность ферментных препаратов бактерий к осуществлению окислительных функций. Но иначе и быть не может, поскольку в молочной кислоте имеется группа COOH, отсутствующая в исходном бродильном материале и являющаяся бесспорным результатом окисления определенной C-группы.

Иной постановкой опытов (ср. Шапошников и Захаров [7]) легко показать, что ферментным системам данных бактерий свойственны такие функции осуществления восстановительных реакций. Опять-таки мы должны сказать, что иначе и быть не может, так как процесс молочнокислого брожения, как типично анаэробный, предполагает равновесное окисление — восстановление.

Исходя из сказанного, чтобы иметь основание разделять точку зрения Дэвиса и других о существовании у гомоферментативных молочнокислых бактерий дыхательного процесса, мы прежде всего должны поставить перед собой вопрос, не является ли то окисление, которое наблюдается в указанной постановке опытов, функцией тех искусственных условий, которые при этом создаются и приводят к искусственному усилению окислительных функций.

Нужно отметить попутно, что далеко не всякое окисление можно рассматривать, как дыхание. Для того чтобы признать его дыхательным процессом нужно прежде всего доказать, что оно является энергетическим процессом, используемым в процессе жизнедеятельности. Иначе под понятие дыхания попадет окисление в присутствии метиленовой синьки щелочного раствора глюкозы (!?)[1].

Предположение о том, что в опытах Дэвиса создаются условия для ненормального повышения окислительных функций ферментных систем, находит себе косвенное подтверждение в указании автора о том, что добавка в реакционной смеси 0,015—0,025% метиленовой синьки в два раза повышает энергию окисления. Это обстоятельство наводит на мысль о том, что в условиях опыта могут иметься в реакционной смеси тела, аналогичные метиленовой синьке, которым таким образом и должен быть приписан эффект Дэвиса.

И действительно, известно, что Warburg [15] было установлено в культурах дрожжей, молочнокислых и некоторых других бактерий наличие так называемого «желтого фермента», оказавшегося телом близким, если не идентичным витамину B_2. Желтый фермент, как известно, подобно метиленовой синьке оказывается способным служить передатчиком кислорода воздуха. Представляется поэтому вполне вероятным, что эффект опытов Дэвиса следует приписать именно желтому ферменту Варбурга и рассматривать его как посмертное явление,

[1] Очевидно потому, что упомянутое вначале остаточное поглощение кислорода, наблюдаемое Бемеке при помощи дифференциального манометра в старых культурах нитробактера, нельзя считать дыханием.

не имеющее прямого отношения к нормальной жизнедеятельности. Таким образом мы склонны притти к заключению, что как опытами с суспензиями бактерий (Bertho, Glück, Davis и др.), так и нашими (Шапошников и Захаров) опытами с метиленовой синькой, серой и т. п., можно без особого труда создать искусственные условия, подчеркивающие окислительные или, наоборот, восстановительные реакции, сопровождающие нормальный процесс. Решение же вопроса о той роли, какая принадлежит этим процессам в нормальной жизнедеятельности данного организма, может быть получено только в биологической обстановке, в условиях оценки их значения для развития и поддержания жизни. С этой точки зрения более перспективным для познания сущности процессов представляется изучение их не в ферментативных болтушках, а в условиях развития организмов.

Это не должно быть понято в том смысле, что мы предлагаем отбросить опыты с ферментными системами, на которых зиждятся многочисленные весьма красивые и убедительные построения современной биологии. Наоборот, мы склонны думать, что только на базе этих данных стало возможно понимание тех процессов, которые связаны с жизнью. Но хотим только лишний раз предостеречь от непосредственного переноса данных опытов с ферментными системами в их количественном выражении на процессы, совершающиеся в биологической обстановке активной жизнедеятельности.

Исходя из сказанного, для оценки тех окислительно-восстановительных реакций, которые разыгрываются при нормальном молочнокислом брожении, мы в своих исследованиях остановились на методе изучения этих процессов при условии развития бактерий в присутствии веществ, не нарушающих значительно самого развития бактерий, но позволяющих в большей или меньшей степени направить их на искусственно вводимые вещества. Для этой цели мы применили метод проведения брожения в присутствии относительно больших количеств метиленовой синьки [1]. Ранее проведенными опытами (Шапошников и Захаров) было выяснено, что введение в субстрат метиленовой синьки до 1,5% переносится Thermobact. cereale без заметного ослабления их развития. Так как даже эта концентрация все-таки относительно не велика, если иметь в виду, что большая молекула краски связывает всего два водородных атома, то при постановке опытов мы остановились на относительно разбавленных субстратах — сусле, с содержанием около 1,5% мальтозы. Краска в виде концентрированного стерилизованного водного раствора добавлялась через 3—4 часа после заражения субстрата культурой бактерий; в параллельную культуру (контроль) добавлялось соответствующее количество стерильной воды. После окончания опыта краска удалялась адсорбцией активированным углем.

Нормальное развитие сопровождается энергичным обесцвечиванием краски. Однако поскольку в наших опытах субстрат не изолирован от соприкосновения с воздухом, на его поверхности постоянно происходит частичное окисление лейкосоединения кислородом воздуха. При замедлении брожения к концу его этот процесс относительно усиливается и жидкость снова начинает приобретать синюю окраску, показывающую, что процесс брожения замедляется.

Таким образом соприкосновение восстанавливаемой краски с воздухом равносильно некоторому увеличению ее содержания, поскольку окислившееся на поверхности лейкосоединение снова обесцвечивается, попадая в более глубокие слои субстрата. Естественно, соотношение между тем и другим процессами определяется как интенсивностью

[1] В опытах Хоревой [4], полученных в нашей лаборатории, по изучению пропионовокислого брожения, для той же цели с успехом было проведено введение в субстрат также гидратов окиси или закиси железа.

брожения, так и отношением поверхности субстрата к его объему, а также степенью подвижности жидкости. Поэтому степень связывания водорода точно учитываться в условиях наших опытов без изоляции поверхности субстрата от воздуха не может.

Надеясь в ближайшее время сообщить дальнейшие экспериментальные данные по этому вопросу на основе проводимого в настоящее время исследования, в порядке предварительного сообщения мы ограничиваемся здесь данными, приводимыми в следующей таблице.

Таблица

№ опыта	Количество сброженного сахара в %	Образовавшаяся молочная кислота в %	Побочные продукты в %	Выход в % от сахара
1. Контроль	1,0	0,99	0,01	99
Метиленовая синька	1,32	0,26	0,46	17
2. Контроль	0,76	0,756	0,004	100
Метиленовая синька	0,97	0,53	0,44	54
3. Контроль	0,9	0,86	0,04	100
Метиленовая синька	1,0	0,58	0,42	58

Таблица показывает прежде всего, что в нормальном брожении практически весь сахар превращается в молочную кислоту, тогда как выход последней при брожении в присутствии метиленовой синьки составляет 54—58% от сброженного сахара (оп. № 2 и № 3), а в некоторых случаях снижается до 17% (оп. № 1).

Снижение выходов молочной кислоты в условиях брожения с метиленовой синькой может зависеть как от того, что сахар не полностью в этих условиях перерабатывается в молочную кислоту, так и от того, что образовавшаяся молочная кислота в условиях повышения энергии окислительных процессов в присутствии активного акцептора водорода подвергается дальнейшему окислению (в соответствии с взглядами Дэвиса и др.).

Второе из приведенных допущений, однако, вряд ли может быть оправдано следующими соображениями.

Уменьшение выходов молочной кислоты в опытах с метиленовой синькой сопровождается, как правило, повышением потребления бродильного материала, что противоречит более глубокому использованию его при окислении. Правда, нужно признать, что в данных опытах недостает учета урожая культуры (подсчета бактерий), что мешает полному сопоставлению результатов.

Наконец, следует отметить, что никаких внешних признаков окисления молочной кислоты — образования уксусной кислоты или углекислоты в опытах с метиленовой синькой не обнаружено.

В порядке подведения итогов мы склонны на основании изложенного притти к следующим выводам.

Наблюдавшееся Дэвисом и другими окисление молочной кислоты ферментными препаратами молочнокислых бактерий не может рассматриваться как выявление нормальных процессов, разыгрывающихся при нормальном развитии бактерий.

Можно думать, что это окисление является постмортальным явлением, возможно связанным с активацией окислительных процессов наличием «желтого фермента» Варбурга.

Более перспективным в смысле изучения соотношений окислительных и восстановительных реакций при гомоферментативном молочнокислом брожении представляется применяемый в наших исследованиях метод ведения процесса в присутствии веществ, не нарушающих развития бак-

терий и в то же время нарушающих нормальное соотношение окислительных и восстановительных реакций.

Особенно перспективным этот метод представляется при изучении анаэробных процессов, там, однако, где он оказывается применимым [1].

Московский государственный университет
Кафедра микробиологии
биологического факультета

Получено 7. IV. 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Дульман Т. Азотистое питание молочнокислых бактерий. Микробиология, т. VIII, 743, 1939.
2. Мантейфель А. и Дратвина Т. Микробиология квашения каракуля. Микробиология, т. VI, 385, 1937.
3. Чекан Л. Микробиология крымской бузы, Тр. Н.-иссл. хим.-фарм. ин-та, вып. 18, 1927.
4. Хорева О. Морфолого-физиологическое исследование пропионовых бактерий. Микробиология, т. X, 293, 1941.
5. Шапошников В. О значении физиологических признаков в систематике микроорганизмов. Микробиология, т. XIII, I, 1944.
6. Шапошников В. и Мантейфель А. К физиологии Bact. Delbrückii. Тр. Н.-иссл. хим.-фарм. ин-та, вып. 5, 1923.
7. Шапошников В. и Захаров И. Die Reduktionserscheinungen bei Milchsäuregärung. Biochem. Z., Bd. 216, 1929.
8. Bertho u. Glück. Lieb. Ann., 494, 159, 1932.
9. Bömeke H. Beitr. zur Physiologie der nitrifizierenden Bakterien. Arch. Mikrob., 10, 385, 1933.
10. Chaix u. Fromageot. Action de quelques dérivés etc... Bull. sur Chim. Biol., 18, 1436, 1936.
11. Davis J. Ueber Atmung u. Gärung von Milchsäurebakterien. Biochem Z., 265, 90, 1933.
11a. Emmerling O. Die Zersetzung stickstoffreier organischer Substanzen durch Bakterien. Braunschweig, 1902.
12. Henneberg W. Handb. d. Gärungsbakteriologie. Bd. I, II, 1926/27.
13. Hermann S. u. Neuschul P. Zur Biochemie d. Essigbakterien etc. Biochem. Z., 233, 129, 1931.
14. Neuberg C. u. Gorr. Mechanismus d. Milchsäurebildung d. Bakterien. Biochem. Z., 162, 1925, 166, 1925, 171, 1926.
15. Warburg O. u. Christian W. Biochem. Z., 260, 499, 1933.

---

[1] Есть случай, когда введение в бродящий субстрат ничтожных количеств метиленовой синьки полностью останавливает как развитие бактерии, так и процесс брожения. К этому вопросу мы вернемся в дальнейшем.

О КЛАССИФИКАЦИИ ЛУЧИСТЫХ ГРИБКОВ ACTINOMYCETALES

Н. А. Красильников

Понятия о лучистых грибках, их классификации и номенклатуре в современной литературе весьма разноречивы и неопределенны. Нет единого мнения не только относительно объема и систематического положения группы лучистых грибков как таксономической единицы, но даже в обозначении основных представителей их существуют большие разногласия. Только для рода актиномицетов насчитывается полтора десятка названий, примерно столько же для проактиномицетов, немного меньше для микобактерий, коринебактерий и других представителей этой группы организмов (Красильников [4, 5]).

Еще менее определенны представления о том, что понимать под лучистыми грибками, каковы границы этой систематической группы. Lehmann и Neumann [17] к лучистым грибкам (Hyphomycetes) относят микобактерии, коринебактерии и актиномицеты (Oospora). Позднее они включили сюда и проактиномицеты. Orla-Jensen [20] к лучистым грибкам относит клубеньковые бактерии, а Bergey в 4-м издании определителя [9] включает еще бактерии Fusiformis, Cytophaga, Mycoplana, Cellvibrio, Cellfalcicola, общий облик и биологические свойства которых ничего общего не имеют с лучистыми грибками. Это чувствовал и сам автор, поэтому в следующем 5-м издании [9] все эти бактерии были устранены отсюда. Pribram [22] выделяет особый подкласс Mycobacteria, в который включает спороносные бактерии (порядок Bacillales) и лучистые грибки (порядок Mycobacteriales). Еще более неопределенное понятие о лучистых грибках дает в своей системе Enderlein [13].

Приведенного уже достаточно, чтобы убедиться в несовершенстве систематики лучистых грибков. Waksman [26] подверг критическому пересмотру существующую терминологию и систематическое положение лучистых грибков. Он предлагает актиномицеты разделить на два рода: Actinomyces — патогенные, строго анаэробные штаммы и Streptomyces — сапрофитные, аэробные штаммы, образующие споры на воздушном мицелии.

Деление актиномицетов на две-три и более групп предлагалось многими авторами. Делили их по признаку патогенности, аэрофильности, по способности образовать воздушный мицелий и т. д. (Красильников [5]). Однако эти подразделения не имели широкого признания, так как практически они трудно осуществимы или во многих случаях совсем недоступны, а теоретически мало обоснованы. Они не коррелируют между собой.

Как известно, патогенные актиномицеты, выделенные из актиномикозных узлов человека и животных, при проверке на животных в громадном большинстве случаев не обнаруживают патогенности; к тому же признак этот, повидимому, очень лабильный. Установить патогенность выделяемых штаммов очень трудно и удается очень редко. Так называемые патогенные штаммы по культуральным, морфологическим и физиологическим признакам не отличаются от сапрофитных штаммов.

Не зная происхождения их, невозможно определить, какие из них сапрофиты или паразиты. Ваксман сочетает с патогенностью еще признак анаэробности для рода Actinomyces. Надо полагать, что все патогенные формы актиномицетов, развивающиеся при свободном доступе

кислорода, не включаются в этот род. Но не включаются они и в другой род Streptomyces. Отсюда возникает необходимость создавать третий род актиномицетов.

Ваксман к стрептомицетам относит сапрофиты, развивающиеся аэробно и образующие споры на воздушных ветках. Все сапрофиты, растущие анаэробно, а таких немало, следовательно, составляют отдельный уже четвертый род. Далее, в природе нередко обнаруживаются актиномицеты, не образующие вообще воздушного мицелия. Для них тоже нет места в системе Ваксмана.

Таким образом мы считаем предлагаемое Ваксманом разделение актиномицетов на два рода не убедительным.

Касаясь проактиномицетов, Ваксман заменяет обозначение этого рода термином Nocardia. Причиной, вызвавшей это, является приоритет. По его данным, Toni и Trevisan (1889) первые описали организмы, которые идентичны с проактиномицетами. Как уже отмечалось мною ранее [5], указанные авторы описали штаммы лучистых грибков, названные в честь французского ученого Нокара (Nocard). Эти организмы, по их данным, представляют типичные лучистые грибки. «Клетки нитевидные, тонкие, ветвящиеся, многие ветки распадаются на кокки». Из описания авторов трудно определить, с чем они имели дело: с актиномицетами или проактиномицетами. Скорее всего с первыми, так как описанный Cohn [12] типичный штам актиномицета (Streptothrix foersteri) они относят в тот же род Nocardia вместе со своими штаммами. Следовательно, мы не видим достаточных оснований для изменения терминологии и этой группы лучистых грибков. Что касается приоритета, то следует отметить, что одновременно с Тревизаном русский ученый Афанасьев [1] также описал возбудителя актиномикозного заболевания у человека с типичными признаками проактиномицетов. Описанный им организм назван Actinocladothrix.

Придерживаясь прежнего своего взгляда, мы считаем целесообразным все же сохранить название Proactinomyces, предложенное Lehmann и Haag [18]. Нельзя согласиться с Ваксманом и относительно систематического положения рода Corynebacterium. Автор относит эту группу к молочнокислым бактериям. Обоснований при этом он не дает. Не вдаваясь в разбор этой группы организмов, отмечу только, что классификация Ваксмана, представленная им ранее [25], более обоснована фактическим материалом и более приемлема, чем только что разобранная, если только исключить из нее род Mycoplana и внести поправки в раздел анаэробов.

На основании собственных исследований и литературных данных мы считаем более естественной классификацией лучистых грибков ту, которая была предложена Леманом и Нейманом. Развивая эту схему с дополнениями Buchanan [11] и Jensen [15] и др., мы изобразили ее в следующем виде [6].

1. Actinomycetaceae имеет четыре рода:

a) Actinomyces. Хорошо развитый мицелий, несептированный; образуют споры в длинных цепочках.

b) Proactinomyces. Нити мицилия септированы, распадаются на более или менее короткие палочки, а иногда на кокковидные элементы.

c) Mycobacterium. Клетки в виде палочек, коротких или длинных, редко образуют рудименты мицелия. Сюда относятся кислотоустойчивые собственно Mycobacterium и некислотоустойчивые Corynebacterium.

d) Micrococcus. Клетки шаровидные, неправильно округленные, с боковыми выступами-почками при прорастании.

2) Micromonosporaceae. Споры на нитях мицелия всегда одиночные. Имеют один род.

Мы считаем нецелесообразным объединять актиномицеты и микромоноспору в одну группу, как это делает Ваксман [26]. Характер ро-

ста и развития на средах, строение клеток, внешний вид культур и, наконец, что особенно важно, образование плодоносных органов очень различаются. По аналогии с грибами они должны быть выделены в самостоятельное семейство.

Объединяя актиномицеты с проактиномицетами, микобактериями и микококками в одно семейство, мы исходили из их филогенетической связи. Мы уже сообщали, что в природе встречаются культуры, которые по своему общему облику представляют промежуточные формы — одни между типичными проактиномицетами и актиномицетами, другие между первыми и микобактериями, третьи между последними и микококками. С другой стороны, применяя метод экспериментальной изменчивости, мы могли непосредственно показать родство этих организмов. Мы получили микобактерии из микококков, проактиномицеты — из микобактерий, а актиномицеты — из проактиномицетов. Подобные факты превращения отмечаются многими исследователями [5].

Этот метод описан нами в 1938 г. Он применяется нами часто во всех тех случаях, когда нужно установить родство тех или других организмов.

В процессе расщепления получаются расы с разными свойствами и разными внешними признаками. Отклонение этих признаков часто идет в сторону тех организмов, с которыми они имеют общий корень происхождения.

Этим методом мы могли установить родство не только указанных представителей лучистых грибков, но и многих других из группы грамположительных неспороносных бактерий.

О микробах, родственных лучистым грибкам

Как уже было указано, к лучистым грибкам в широком смысле относим актиномицеты, проактиномицеты, микобактерии с коринебактериями, микококки и микромоноспору.

Ограничивается ли данная группа указанными организмами или к ней примыкают какие-либо другие?

Многие авторы пытались к лучистым грибкам присоединить разные формы микроорганизмов без достаточных на то оснований или без всяких оснований (см. выше).

Такие организмы, как возбудитель перипневмонии или возбудитель рожистого воспаления (Erysipelothrix), мало изучены, чтобы можно было их сопоставить с каким-либо представителем лучистых грибков. Другие же, как например, возбудитель сапа (Pfeifferella), микоплана, клубеньковые бактерии, совершенно отличны от них.

Большой интерес с точки зрения родства с лучистыми грибками представляют грамположительные неспороносные бактерии. Какова связь их с лучистыми грибками? Не являются ли они филогенетически родственными организмами? Этот вопрос давно нас занимал и на протяжении ряда лет изучался на разных культурах бактерий, выделенных из почвы, воды, из различных тканей человека и животных и других субстратов. Мы отбирали все грамположительные, неподвижные, неспороносные бактерии и подвергали их тщательному исследованию. В общей сложности было изучено более 500 культур. Мы сопоставляли их с сапрофитными микобактериями и коринебактериями.

Как известно, к микобактериям и коринебактериям мы относим микроорганизмы, которые имеют характерное строение клеток с типичным ветвлением и определенным циклом развития. Ветвление у них является совершенно нормальным и закономерным процессом при развитии культуры в благоприятных условиях. Оно отличается от дегенеративного ветвления, наблюдаемого у многих бактерий при условиях ненормального развития. У микобактерий ветки представляют собой остатки, сохранив-

шиеся от ветвления у актиномицетов; наблюдаемое ветвление клеток у бактерий (спороносных и неспороносных, как, например, у уксусных, азотобактера, у клубеньковых бактерий и др.) образуется в процессе глубокого перерождения клеток и, как правило, такие клетки являются летальными или сублетальными. Весьма характерным и стойким признаком у микробактерий является окраска по Граму, т. е. способность плазмы поглощать и стойко удерживать краску. Признак этот должен рассматриваться с точки зрения особого химического состава или состояния живого вещества клеток. Замечательно то, что это свойство плазмы распространяется не только на поглощение красок, но и на некоторые другие вещества, например, антибиотики, сульфаминовые соединения, вещества, выделяемые микробами (особенно некоторыми актиномицетами).

Грамположительные бактерии, как правило, более чувствительны к антибиотикам, чем грамотрицательные. Нами получено от A. violaceus вещество мицетин [7], которое действует только на грамположительные микробы, в том числе и на микобактерии. Причем это свойство настолько постоянно, что может служить диагностическим целям [2]. Надо полагать, что акцептором краски и антибиотиков является одно и то же вещество или часть плазмы, присущая всем грамположительным бактериям, представителям лучистых грибков, но не дрожжам или вообще грибкам и не простейшим.

Для микобактерий не менее характерно строение клеток: неправильная форма, неровная контурность, искривленность клеток, а также зернистое содержимое. Все это является первым опознавательным признаком при микроскопировании культур.

В процессе развития эти организмы в типичных случаях имеют последовательную очень наглядную смену форм от длинных палочек до кокковидных клеток.

Таким образом, мы видим, что основными признаками микобактерий и коринебактерий являются: строение и развитие клеток, окраска по Граму и ветвление их.

При массовом исследовании культур микобактерий (коринебактерий) не всегда четко выявляются некоторые их признаки. Например, у некоторых видов ветвление обнаруживается редко и не на всех средах или вовсе не обнаруживается.

Другие признаки — искривленность, зернышки внутри клеток, расчленение палочек на кокки — тоже не всегда резко проявляются. В таких случаях культуры похожи на обычные грамоположительные бактерии. Природу таких бактерий удается выявить только при тщательном микробиологическом изучении. При этом окончательным и решающим этапом является экспериментальное получение рас.

Результаты наших исследований над бактериями показывают, что в почве, в воде и других субстратах не обнаруживаются грамположительные, неспороносные бактерии, которые не имели бы сходства с микобактериями или коринебактериями. Все они имели более или менее характерное строение клеток; многие из них при расщеплении давали расы с ясно выраженным ветвлением.

На основании этих исследований мы считаем, что, если не все, то значительная часть грамположительных неспороносных и неподвижных бактерий имеет родственную связь с микобактериями. Причем связь эта у одних штаммов более отдаленная, у других более близкая. Они должны быть выделены в особую группу или род, филогенетически близкий к лучистым грибкам. Мы предлагаем назвать его Pseudobacterium, ибо эти организмы не являются бактериями в узком понимании этого термина.

Следует подчеркнуть, что эти бактерии ничего общего не имеют с грамположительными, спороносными и подвижными бактериями (кор-

ни происхождения последних надо искать среди других представителей микрофлоры).

К лучистым грибкам близко примыкают пропионовокислые и молочнокислые бактерии.

Freudenreich и Orla-Jensen [14], хорошо изучившие выделенные ими штаммы пропионовокислых бактерий, дают им следующую характеристику: грамположительные палочки, искривленные, неправильно очерченные, часто четкообразные со вздутиями; клетки ветвящиеся, при развитии они укорачиваются до кокковидных форм.

Как видно из этого описания авторов, и особенно из микрофотографий, приложенных ими, эти организмы очень сходны с микобактериями. Werkman и Brawn [28] при тщательном изучении этой группы организмов дают аналогичную характеристику и относят их к коринебактериям.

К пропионовокислым бактериям близко стоят молочнокислые бактерии. Tissier [23] описал один штамм бактерий под названием Bacillus bifidus, который по морфологическим признакам и развитию не отличается от представителей микобактерий или коринебактерий. Моro [19] выделил из кишечника слона такую же палочку и назвал ее B. acidophilus. Та и другая форма свертывают молоко и относятся к группе молочнокислых бактерий. Weiss и Rettger [27] и Breit [10], подробно изучившие оба эти организма, относят их к коринебактериям. В отличие от истинных молочнокислых бактерий, они образуют, кроме молочной кислоты, значительное количество (30—40%) летучих кислот. На основании этого Orla-Jensen и Winter [21] считают данных микробов промежуточными формами между пропионовокислыми и молочнокислыми бактериями. Такого же мнения придерживается и Королев [3].

Kluyver и van Niel [16] в своей системе совершенно справедливо относят к коринебактериям, т. е. к некислотоустойчивым микобактериям пропионовокислые бактерии, а также молочнокислые Streptobacterium, Betabacterium и термобактерии. Объединение пропионовокислых и молочнокислых бактерий с микобактериями Шапошников [8] считает вполне приемлемым.

При изучении кокковидных форм лучистых грибков, обозначенных нами [5], как микококки, мы отмечали их сходство с микрококками. Возникает вопрос, не обусловлено ли это сходство генетической близостью их?

Если устраняется у микококков последний признак — почкование, сохранившийся от более высоких представителей лучистых грибков как рудимент веток, то они не отличаются от обычных культур микрококков.

В той же работе мы отмечали, что решающим доводом при диагностике микококков является образование микобактериальных рас в процессе расщепления их. Было описано 12 кокковидных культур, по внешнему виду принадлежащих к микрококкам, но которые при расщеплении дали расы с типичными признаками микобактерий.

С того времени мы имели немало других культур (не менее 100), которые при выделении из природного субстрата диагносцировались как микрококки, а впоследствии отщепляли палочковидные ветвящиеся расы.

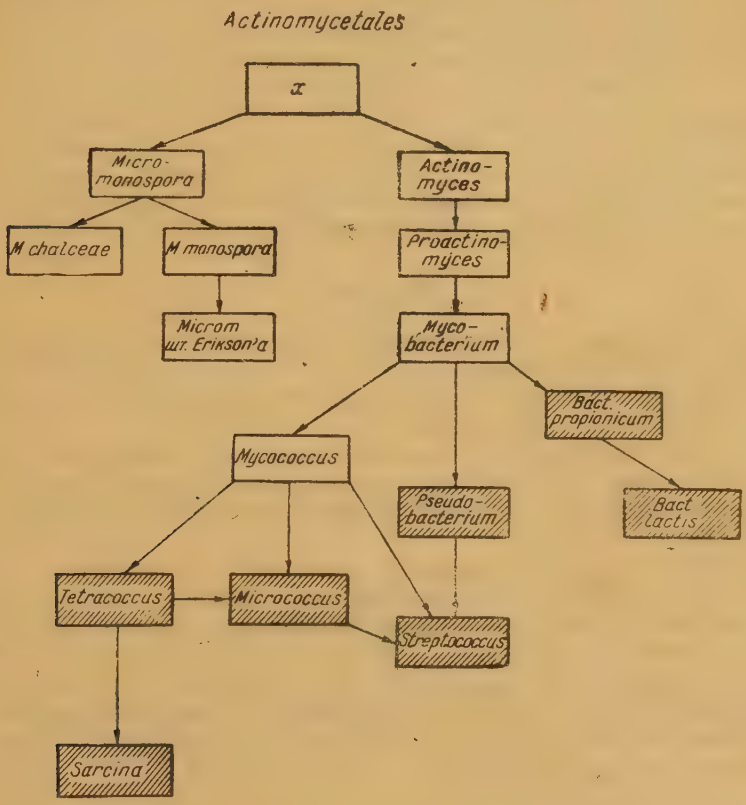
Эти наблюдения подтверждают нашу точку зрения, высказанную в 1938 г. о генетической связи микококков с микрококками. Последние, надо полагать, имеют свои корни от микококков. Подобно тому, как через микобактерии и коринебактерии имеется связь с грамположительными неподвижными и неспороносными бактериями, в том числе с пропионовокислыми, мы также наблюдаем аналогичную связь с микрококками, а следовательно, и другими представителями кокков через микококки.

Если это так, то грамположительные неспороносные, неподвижные бактерии противопоставляются, с одной стороны, грамотрицательным

бактериям, а с другой — спороносным подвижным грамположительным бактериям.

При указанном сопоставлении следует учитывать то обстоятельство, что спороносные бактерии могут терять способность образовывать споры и подвижность и превращаются в неподвижные грамположительные формы.

В своих исследованиях, впрочем, мы никогда не обнаруживали в природных условиях хорошо дифференцируемых спороносных бактерий без спор. Такие, повидимому, могут существовать только в искусственных условиях.



Kluyver и Niel [16] считают первичной формой в эволюции бактерий кокки. От них через стрептококки эволюция идет в одних случаях к неподвижным палочковидным бактериям, а в других случаях — к ветвящимся микобактериям. От кокков также берут свое происхождение тетракокки и сарцины. В этой эволюции, по мнению авторов, существенным моментом является полярность направления деления клеток.

Эта полярность является связывающим признаком между стрептококками и палочковидными формами бактерий. По справедливому замечанию Шапошникова, этот признак не может быть решающим, а во многих случаях он несуществен. В литературе имеется много указаний на то, что многие организмы в процессе развития образуют кокковидные формы путем распада палочек.

По нашему мнению, стрептококки могут образоваться не только от первичных кокков, но и от микококков, т. е. от деградированных форм лучистых грибков с установившимся строго определенным полярным направлением деления клеток.

Некоторые виды микококков (M. tetragenus) имеют биполярное, хотя и не строго установившееся деление, вернее почкование клеток. В ре-

зультате такого размножения получаются комплексы клеток в виде двойных цепочек или табличек — тетракокков [6].

Подводя итог изложенному, мы должны подчеркнуть, что бактерии настолько разнообразны, что их нельзя объединить в одну таксономическую единицу. Они, как отмечают многие авторы, полифилитического происхождения.

Разбираемые нами организмы — грамположительные неспороносные, неподвижные бактерии — имеют генетическую связь с актиномицетами. Последние, как уже указывалось ранее [5], представляют совершенно обособленную группу организмов, скорее примыкающую к грибам по внешнему облику и биологическим свойствам, чем к бактериям. Они должны быть выделены в отдельный класс, как это предлагает Шапошников, или порядок, параллельный другим самостоятельным классам или порядкам. От актиномицетов происходят проактиномицеты, микобактерии, микокки в одну сторону и микромоноспора — в другую (см. рис.).

От микобактерий и коринебактерий идет связь к грамположительным, неспороносным бактериям или псевдобактериям, пропионовокислым и молочнокислым бактериям. От микококков связь идет к микрококкам, затем к стрептококкам и тетракоккам, а дальше — к сарцинам.

Выводы

1. Лучистые грибки Actinomycetales представляют собой обособленную группу микроорганизмов.
2. К лучистым грибкам относятся проактиномицеты, микобактерии с коринебактериями и микококки.
3. В более или менее отдаленном родстве с лучистыми грибками находятся многие, если не все, грамположительные неспороносные, неподвижные бактерии, в том числе пропионовокислые и молочнокислые бактерии.
4. Микрококки имеют отдаленное родство с микококками.
5. В диагностической классификации бактерий группа лучистых грибков вместе с грамположительными неспороносными палочками и кокками противопоставляется группе грамотрицательных бактерий и группе спороносных и подвижных грамположительных бактерий.
6. Лучистые грибки должны занимать в классификации микробов самостоятельную таксономическую единицу параллельно с другими самостоятельными группами.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 28.III.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев М. Об этиологии актиномикоза. «Врач», № 10, стр. 47, 1889.
2. Кореняко А. Биологический метод распознавания микобактерий. ДАН СССР, т. 23, № 2, 1939.
3. Королев С. Основы технической микробиологии молочного дела. Москва, 1932.
4. Красильников Н. Новый род «лучистых грибков» — Mycococcus. Микробиология, т. VII, вып. 3, 1938.
5. Красильников Н. Лучистые грибки Actinomycetales, Москва, 1938.
6. Красильников Н. Определитель лучистых грибков. Москва, 1941.
7. Красильников Н. и Кореняко А. Бактерицидное вещество актиномицетов. Микробиология, т. VIII, вып. 6, 1939.
8. Шапошников В. О значении физиологических признаков в систематике микроорганизмов. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, 1942.
9. Bergey D. Manual determinative bacteriology, 4th ed., 1934, and 5th ed., 1939.
10. Breit E. Studien über die Darmflora des Menschen 1935. Diss. Kiel. Ref. Biol. Abst., Bd. 10, No. 5, 1936.
11. Buchanan R. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. J. Bact., v. 2, p. 155, 1917; v. 3, p. 403, 1918.

12. Cohn F. Untersuchungen über Bakterien. I, Beitr. Biol. Pflanz. Bd. I, S. 127.
13. Enderlein G. Sitzber. Ges. Naturw. Freunde, Berlin, S. 309, 1917, (цит. по Bergey, 1939).
14. Freudenreich E. u. Orla-Jensen. Ueber die im Emmentalerkäse stattfindende Propionsäuregärung. Ctbl. Bakt., II, Bd. 17, S. 529, 1906.
15. Jensen H. Contribution to our knowledge of the Actinomycetales, Proc. Linn. Soc., N. S. W. v. 56, p. 56, 57, 1931; v. 57, p. 173, 364, 1932; v. 58, p. 181, 1933; v. 59, p. 19, 101, 200, 1933; v. 61, p. 27, 1935.
16. Kluyver A. u. van Niel C. Prospects for a natural system of classification of Bacteria. Ctbl. f. Bakt., II, Bd. 94, S. 369, 1936.
17. Lehmann K. u. Neumann R. Bakteriologische Diagnostik, 1896.
18. Lehmann K. u. Haag (1917). Цит. по Lehmann u. Neumann. Bakteriologische Diagnostik, 1927.
19. Moro E. Ueber die nach Gramfärbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles. Wien, Klin. Wochenschr., Bd. 13, S. 114, 1900.
20. Orla-Jensen S. Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems Ctbl. Bakt. II, Bd. 22, S. 305, 1909.
21. Orla-Jensen S. u. Winter O. Bacterium bifidum und thermobacterium intestinale. Ctbl. Bakt, II, Bd. 93, S. 321, 1935.
22. Pribram E. Klassification der Schizomyceten. Leipzig, 1933.
23. Tissier H. Цит. по Orla-Jensen, 1909.
24. Toni G. et Trevisan V. Schizomycetaceae. Saccardo Sylloge fungorum, Padua, 1913.
25. Waksman S. On the classification of Actinomycetes J. Bact., v. 39, No. 5, 1940.
26. Waksman S. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. J. Bact., v. 46, No. 4, 1943.
27. Weiss J. a Rettger. Lactobacillus bifidus. J. Bact., v. 38, p. 501, 1934.
28. Werkman C. a. Brawn R. The propionic acid bacteria I. Classification. J. Bact., v. 26, p. 393, 1933.

ON THE CLASSIFICATION OF ACTINOMYCETALES

N. A. Krassilnikov

Summary

1. The Actinomycetales form a separate group of microorganisms.

2. The Actinomycetales include the Proactinomyces, the Mycobacterium with the Corynebacterium and the Mycococcus.

3. Many, if not all, grampositive non-sporing immobile bacteria, among them propionic acid and lactic acid bacteria are distantly related to the Actinomycetales.

4. Micrococci are distantly related to mycococci.

5. In the diagnostical classification of bacteria the Actinomycetales group together with the non-sporing grampositive rods and cocci is differentiated from the group of gramnegative bacteria and the group of sporulating and mobile grampositive bacteria.

6. The Actinomycetales must occupy in the classification of microbes the position of an independent taxonomic unit parallel with other independent groups.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРОЕНИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

А. Е. Крисс, Е. А. Рукина и *Б. М. Исаев*

Актиномицеты представляют собой группу микроорганизмов, которые имеют много общего в строении клеток с бактериями и грибами. Способность к образованию развитого, ветвящегося мицелия с органами плодоношения, казалось бы, сближает их с грибами, но, с другой стороны, ничтожная толщина нитей, отсутствие поперечных перегородок и т. п. дают основание Афанасьеву [1] и другим авторам полагать, что нить актиномицета — это гигантски удлиненная бактериальная клетка. В новейшей монографии об актиномицетах (Красильников [2]) последние рассматриваются как самостоятельные организмы с присущими им типичными морфологическими, культуральными и физиологическими признаками.

Различные точки зрения на местоположение лучистых грибков в системе микроорганизмов объясняются в первую очередь недостаточными сведениями об их внутренней организации. Нужно учесть, что многие наблюдения, касающиеся структурных особенностей мицелия, способов образования воздушных спор и т. п., были сделаны почти на грани видимости светового микроскопа, вследствие малых поперечных размеров гиф актиномицетов. Нам казалось поэтому рациональным для разрешения ряда спорных вопросов морфологии актиномицетов приступить к исследованиям деталей строения этих организмов при увеличениях, превышающих возможности светового микроскопа, использовав для этой цели электронный микроскоп. Описание первых наблюдений, проведенных с помощью моделей В электронного микроскопа фирмы RCA при напряжении в 55—60 кв, и составляет содержание настоящей статьи.

Методика

Для исследования были взяты два вида актиномицетов: Actinomyces coelicolor и Actinomyces viridis. Культуры микроорганизмов выращивались при $t = 28°$ на жидкой и плотной средах Czapek: дестиллированной воды — 100,0 см³; K_2HPO_4—0,1 г; $MgSO_4$—0,05 г; KCl—0,05 г; $NaNo_3$—0,2 г; $FeSO_4$—0,001 г; сахарозы — 3,0 г и агар-агара 1,5 г.

Препараты из культур на жидкой среде готовились следующим способом. Часть мицелия увлекалась петлей со дна пробирки и вносилась в каплю дестиллированной воды, нанесенную на покровное стеклышко. Стеклышко укреплялось на внутренней поверхности крышки чашки Петри, на дно которой наливался формалин. Легкий подогрев чашки до температуры 30—35° позволял осуществлять фиксацию опытного материала парами формалина в короткий срок, 6—7 минут. После фиксации нити мицелия распределялись на пленке сеточки, которая затем помещалась в электронный микроскоп.

Изучение строения воздушного мицелия производилось на препаратах-отпечатках. Вырезывались прямоугольные блоки агара с колониями актиномицетов, они фиксировались по вышеуказанной методике, а за-

тем осторожно прикладывались поверхностью колоний непосредственно к пленке. После небольшого опыта удавалось получать препараты, в которых цепочки спор сохранялись в ненарушенном состоянии.

Электронно-микроскопические наблюдения

Первое, что обращает на себя внимание при рассмотрении в электронном микроскопе препарата мицелия актиноцметов,— это неодинаковая толщина гиф. Поперечные размеры мицелиальных нитей в двухсуточной культуре Actinomyces coelicolor варьируют от 0,5 μ до 0,13 μ (рис. 1). Пока трудно судить, в какой мере неоднородная толщина мицелия зависит от различного возраста нитей,— здесь нужно учесть возможность приостановки развития тонких нитей в силу тех или других причин, но несомненно, что процесс роста клетки может протекать не только в виде удлинения гифы, но и в виде более или менее значительного утолщения ее.

Насколько малыми могут быть поперечные размеры мицелиальных нитей, дает представление рис. 2. Минимальная толщина их составляет 0,08—0,09 μ, т. е. лежит вне пределов видимости светового микроскопа. Данный факт примечателен, ибо он не только наглядно демонстрирует значение метода электронной микроскопии, но и подкрепляет мнение Sartory A., Sartory R. et Meyer [6], Monal [5] и др. о существовании фильтрующихся форм у актиномицетов.

Давнишний спор о наличии поперечных перегородок в мицелии актиномицетов, надо полагать, получил свое окончательное разрешение с помощью электронного микроскопа. В соответствии с наблюдениями Waksman [7], Крисса [3], Красильникова [2] и др. мы не обнаружили при электроноптических увеличениях в 5 000—8 000 раз каких-либо признаков септирования гиф ни по длине их, ни в местах отхождения боковых ветвей.

Оболочка мицелиальных нитей электроноптически видна в виде более или менее ясных контуров, в зависимости от плотности плазменного содержимого в данном месте нити. Контуры обычно представляют собою волнистую линию, что обусловлено обилием крупных включений, раздувающих поперечник гифы (рис. 1). При внимательном рассмотрении этой фотографии можно также заметить участие оболочки материнской нити в образовании выроста-почки, дающей начало боковым побегам. Более отчетливо мы наблюдали оболочку в препарате мицелиальной нити, у которой боковой отросток был поврежден, а затем, повидимому, вновь стал удлиняться (рис. 3). В результате частичной контракции плазмы на поврежденном участке гифы оболочка выступает в виде футляра, как это нередко встречается у бактерий.

Плазменное содержимое мицелия актиномицетов, особенно тонких гифов, выглядит электроноптически неоднородным, что свидетельствует о наличии различного рода включений. На рис. 2 шаровидные, овальные или удлиненной формы образования довольно отчетливо вырисовываются на зернистом фоне протоплазмы. Некоторые фигуры напоминают деление ядра, но пока трудно судить о том, образуются ли круглые и овальные формы из палочковидных или последние являются продуктом слияния более мелких зерен в результате продолжающегося процесса «отмешивания» плазменных нуклеопротеидов. Вполне вероятно, что эти структуры представляют собою хроматиновую субстанцию. Красильников [2] и другие исследователи находили в плазме актиномицетов наряду с метахроматином и включения, состоящие из хроматина. Провести, однако, полную аналогию, без дальнейших исследований нам не представляется еще возможным. Точно так же только различную степень приближения к истине могут иметь предположения, что зерна, менее интенсивно поглощающие электронные лучи, в изобилии распреде-

Рис. 1. Actinomyces coelicolor. 2-суточная культура на жидкой среде Czapek. Увеличение: электронооптически — ×5 000, общее — ×15 500

Рис. 2. Actinomyces coelicolor. 10-суточная культура на жидкой среде Czapek. Увеличение: электронооптически — ×5 000, общее — ×11 500

Рис. 3. Actinomyces coelicolor. 4-суточная культура на жидкой среде Czapek. Увеличение: электронооптически — ×5 000, общее — ×14 500

Рис. 4. Actinomyces coelicolor. 10-суточная культура на жидкой среде Czapek. Увеличение: электронооптически — ×8 000, общее — ×16 800

Рис. 5. Actinomyces viridis. Отпечаток воздушного мицелия из 5-суточной культуры на плотной среде Czapek. Увеличение: электронооптически — × 8 000 общее — ×20 000

Рис. 6. Actinomyces viridis. Отпечаток воздушного мицелия из 10-суточной культуры на плотной среде Czapek. Увеличение: электронооптически ×8 000, общее — ×24 000

Рис. 7. Actinomyces viridis. Отпечаток воздушного мицелия из 12-суточной культуры на плотной среде Czapek. Увеличение: электронооптически ×8 000, общее — ×20 800

Рис. 8. Actinomyces viridis. Отпечаток воздушного мицелия из 15-суточной культуры на плотной среде Czapek. Увеличение: электронооптически — ×8 000, общее — ×19 200

Fig. 1. Actinomyces coelicolor. 2 days' growth in Czapek liquid medium. Magnification: electronooptical — ×5 000; total — ×15 500

Fig. 2. Actinomyces coelicolor: 10 days' growth in Czapek liquid medium. Magnification: electronooptical — ×5 000; total — × 11 500

Fig. 3. Actinomyces coelicolor. 4 days' growth in Czapek liquid medium. Magnification: electronooptical — ×5 000; total — × 14 500

Fig. 4. Actinomyces coelicolor. 10 days' growth in Czapek liquid medium. Magnification: electronooptical — × 8000; total — × 16 800

Fig. 5. Actinomyces viridis. Impression-preparation of aerial mycelium from a 5 days' growth on Czapek solid medium. Magnification: electronooptical — × 8 000; total — ×20 000

Fig. 6. Actinomyces viridis. Impression-preparation of aerial mycelium from a 10 days' growth on Czapek solid medium. Magnification: electronooptical — ×8 000; total — ×24 000

Fig. 7. Actinomyces viridis. Impression-preparation of aerial mycelium from a 12 days' growth on Czapek solid medium. Magnification: electronooptical — ×8 000; total — × 20 800

Fig. 8. Actinomyces viridis. Impression-preparation of aerial mycelium from a 15 days growth on Czapek solid medium. Magnification: electronooptical — ×8 000; total — ×19 200

1
2
3
4
5
6
7
8

ляющиеся по нитям, соответствуют резервным веществам или связаны с дегенеративными явлениями в плазме.

В 10-суточной культуре Actinomyces coelicolor на жидкой среде мы встретили раздутые клетки, имеющие неправильно округлую, овальную или вытянутую форму (рис. 4). Поперечные размеры их нередко превышают толщину нити, достигая 0,7—0,9 μ. Клетки выглядят электроноптически «пустыми» или имеют внутри отдельные участки слабого поглощения. Судя по хорошо выраженной периферической кайме, часть плазменного содержимого уплотнена у оболочки. Между отдельными раздутыми клетками заметна поперечная перегородка. Повидимому, они представляют собой инволюционные формы мицелия или, возможно, это деформированные воздушные споры, упавшие на дно пробирки из колоний поверхностного роста.

Споры актиномицетов электроноптически отличаются от спор бактерий. Содержимое их не столь плотно и уже вскоре после закончившегося процесса фрагментации материнской воздушной нити претерпевает ряд изменений. Мы приводим 3 фотографии (рис. 5, 6, 7), которые дают примерное представление о последовательности явлений перераспределения веществ в плазме сформировавшейся споры. Вначале споры теряют свой гомогенно-черный цвет, в них появляются просветы у боковых стенок, вызванные стягиванием части плазмы по продольной оси клетки. Возникающая затем перешнуровка приводит к появлению своеобразных фигур «восьмерок». На одной из конечных стадий спора имеет у полюсов участки интенсивного поглощения электронных лучей, а в центре между ними — светлый промежуток. Внешне наблюдаемые картины очень напоминают «отмешивание» плазменного содержимого у бактерий (Крисс, Рукина, Исаев, [4]). Если учесть, что в старых культурах актиномицетов часто встречаются узкие длинные чехлы, имеющие вид опустевших мицелиальных нитей, то представляется весьма вероятной связь вышеописанных явлений со старением споры. «Старые» споры в отличие от спор с неизмененной плазмой легко деформируются. В препаратах-отпечатках наряду с клетками уродливо искаженной формы нередко попадаются споры со спавшейся оболочкой и тонкой нитью плазмы (рис. 8).

Приведенный материал пока содержит лишь отрывочные данные о строении актиномицетов, но он дает наглядное представление о перспективах, которые открываются с применением электронного микроскопа в области изучения цитологии и истории развития этой группы микроорганизмов.

Выводы

1. Гифы актиномицетов в одной колонии имеют раличную толщину. Некоторые из них настолько тонки, что лежат вне пределов видимости светового микроскопа.

2. Оболочка мицелиальных нитей видна в виде более или менее ясных контуров. Отчетливо она выступает на участках мицелия, в которых произошла контракция плазмы. Поперечные перегородки в нитях при больших увеличениях не обнаруживаются.

3. Плазменное содержимое мицелия актиномицетов электроноптически не однородно. Наряду с мелкими, едва заметными зернами, встречаются крупные шаровидные, овальные и удлиненной формы включения, интенсивно поглощающие электронные лучи.

4. В старых культурах на жидкой среде попадаются раздутые клетки неправильной формы с поперечными размерами, превышающими толщину гиф. Они выглядят электроноптически пустыми или имеют внутри участки слабого поглощения.

5. Плазма спор актиномицетов после сформирования их претерпевает ряд изменений. В препаратах наблюдаются все переходы от гемо-

генно-черных спор до спор, имеющих полярные участки интенсивного поглощения с «пустыми» промежутками в центральной части. Споры с измененным плазменным содержимым легко деформируются.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР и
Лаборатория биофизики Всесоюзного
института экспериментальной медицины
Москва

Получено 5.II.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев. Об этиологии актиномикоза. Врач, № 10, 47, 1889.
2. Красильников Н. Лучистые грибки и родственные им организмы (Actinomycetales). Изд. Академии Наук СССР, 1938, Москва—Ленинград.
3. Крисс А. Изменчивость актиномицетов. Изд. Академии Наук СССР. 1937, Москва—Ленинград.
4. Крисс А., Рукина Е. и Исаев Б. Некоторые наблюдения над цитологией бактерий с помощью электронного микроскопа. Изв. Академия Наук СССР, сер. биол., № 4, 1945.
5. Monal P. Contribution à l'étude des actinomycoses. Le cycle évolutif des «Actinomycoses» dans les cultures et dans l'organisme animal. Bull. Inst. Past., 34, 260, 1936.
6. Sartory A., Sartory R. et Meyer J. Le cycle évolutif des Actinomyces dans les cultures après passage à travers l'ultrafiltre de colloidion. C. R. Acad. Sci. Paris, 197, 1465, 1933.
7. Waksman S. Cultural studies of species of Actinomyces. Soil Sci., 8, 71, 1919.

ELECTRONE MICROSCOPIC STUDIES ON THE STRUCTURE OF ACTINOMYCETES

A. E. Kriss, E. A. Rukina and *B. M. Issaiev*

Summary

1. The hyphae of Actinomycetes in the same colony differ in thickness. Some of them are so thin that they are beyond the limits of sight of the optic microscope.

2. The envelope of mycelial filaments is visible as more or less clear contours. It shows more vividly in those areas of the mycelium, in which contraction of the plasm has taken place. Transversal septa in the filaments cannot be detected at high magnifications.

3. The plasmatic contents of the mycelium of Actinomycetes is not uniform electronooptically. Large spheric, oval or elongated inclusions, intensely absorbing the electrone rays are encountered in them alongside of fine hardly visible granules.

4. In old cultures in liquid media bloated cells of an irregular shape, their transversal dimensions exceeding the thickness of the hyphae, are sometimes encountered. Electronooptically they appear empty or show areas of weak absorption inside.

5. The plasm of the spores of Actinomycetes goes after their formation through a series of changes. Every transitory form from homogeneously black spores to spores with polar areas of intense absorption and «empty» intervals in their central part may be observed in the preparations. Spores with changed plasmatic contents lose their shape easily.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
and Laboratory of Biophysics of the All-Union Institute of Experimental Medicine
Moscow

НИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ И МИКСОБАКТЕРИИ

А. А. Имшенецкий

В 1890 г. Виноградский опубликовал результаты своих классических исследований по нитрификации, и в дальнейшем на протяжении сорока лет Nitrosomonas безраздельно господствовал как единственный вид нитрозобактерий.

Однако в дальнейшем произошли перемены.

В 1928 г. Romell нашел новые виды нитрификаторов, образующих крупные цисты. Несколько позже он обнаружил такие же организмы в американских почвах и описал их под именем Nitrosocystis. Они давали крупные желтые, очень плотные цисты, состоящие из небольших цист, в которых содержались мелкие палочки. В 1933 г. Виноградский и Виноградская, изучая нитрифицирующих бактерий почвы, обнаружили представителей хорошо известного рода Nitrosomonas и организмы, относящиеся к роду Nitrosocystis, в общем сходные с видами, описанными Romell. При исследовании образца почвы, присланного Б. Л. Исаченко и взятого им на Новой Земле, они нашли вид, образующий длинные извитые нити, который Виноградский отнес к новому роду Nitrosospira.

В 1935 г. Boltjes наблюдала развитие одноклеточных культур Nitrosomonas и пришла к выводу, что Nitrosomonas и Nitrosocystis — один и тот же вид, с чем трудно согласиться, так как совершенно очевидно, что в ее распоряжении не было культур Nitrosocystis.

В 1935—1937 гг. Виноградская описала ряд видов нитрозобактерий, изолированных из активного ила и относящихся к Nitrosomonas, Nitrosocystis и новому виду Nitrosogloea.

Таким образом за последние пятнадцать лет описан целый ряд новых форм нитрифицирующих бактерий, и тем самым выдвигается тезис о том, что способность к нитрификации широко распространена среди микробов. Следует отметить три обстоятельства. Во-первых, никто из исследователей не имел чистых культур новых видов, во-вторых, развитие зооглей и цист на геле, сопровождающееся растворением мела, принималось как абсолютное доказательство аутотрофности микроорганизма, и, наконец, в-третьих, все новые виды нитрифицирующих бактерий описывались слишком кратко, и это затрудняло их систематику.

Экспериментальная часть

Методика

Для выделения накопительных культур нитрифицирующих бактерий производился посев комочков почвы на пластинки кремнекислого геля. Чашки Петри с кремнекислым гелем пропитывались, как это рекомендовал Виноградский, 2 см³ солевого раствора следующего состава: K_2HPO_4 0,5 г, $MgSO_4$ 0,3 г, NaCl 0,3 г, $FeSO_4$ 0,02 г, $MnSO_4$ 0,02 г. Водопроводной воды 200,0. В этой среде вместо химически чистого хлористого натрия применялась техническая (столовая) поваренная соль. Затем чашки подсушивались, и на них наливался 1 см³ 5% раствора сернокислого аммония. Чашки помещались в термостат, и на подсохшую поверхность гелевых пластинок наносилась «болтушка», приготовленная из мела (на каждую чашку 1 г), и чашки с гелем снова подсушивались. На белую эмалированную поверхность гелевой пластинки с помощью петли, периодически увлажняемой стерильной водопроводной водой, производился посев комочков почвы. Последние располагались рядами и обычно в чашке, имеющей 10 см в диаметре, размещалось 25—35 комочков.

почвы. Посевы выдерживались в термостате при 25°. Чашки с более старыми посевами помещались в эксикатор, на дне которого была налита вода.

Материал для микроскопии с гелевых пластинок переносился с помощью игол или маленькой петли, сделанной из очень тонкой платиновой проволоки. Это позволяет брать материал только в нужном месте, не затрагивая соседних участков гелевой пластинки.

Культивирование нитрозобактерий производилось также в жидкой среде Boltjes следующего состава $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 г, K_2HPO_4 1,0 г, NaCl (техническая) 2,0 г, $MgSO_4$ 0,5 г, $FeSO_4$ 0,4 г, мел 10,0 г, вода 1 000,0. Среда разливалась слоем в 1,5—2 см в колбочки Эрленмейера емкостью в 100 $см^3$. Колбы с посевами помещались в термостат, температура в котором была 25°. Содержащий бактерии осадок со дна колб переносился для микроскопии на предметное стекло. Осуществлялось это большой петлей овальной формы 0,5 × 1 см величины. Для удобства петля была согнута под прямым углом, и это позволяло брать материал, не наклоняя колбы, т. е. не приводя в движение осадок на дне.

Материал, взятый с пластинки кремнекислого геля или из колб, перенесенный в каплю воды, предварительно нанесенную на предметное стекло, обычно обрабатывается слабым раствором HCl для растворения мела. При этом следует избегать избытка кислоты. Затем капля либо покрывалась покровным стеклом и микроскопировалась непосредственно, либо препарат фиксировался и окрашивался. В процессе работы я убедился, что применять специальные краски, как это иногда рекомендуют, нет необходимости. Хорошие результаты получаются при окраске метиленовой синькой, генцианвиолетом, эритрозином и другими красками. При окраске метиленовой синькой большое значение имеет продолжительность окраски объекта. В дальнейшем я еще вернусь к этому.

Для обнаружения нитритов служил реактив Тромсдерфа, с помощью которого, руководствуясь насыщенностью получаемой окраски, можно судить об интенсивности процесса нитрификации. Для качественной пробы на аммиак применялся реактив Несслера. После исчезновения аммиака в колбы добавлялся 5% раствор сернокислого аммония. В опытах с чашками этот же раствор при отрицательной реакции на аммиак с кусочками кремнекислого геля наливался в углубления, специально вырезанные в пластинках кремнекислого геля. Таким путем производилась «подкормка» культур.

Помимо общеупотребительных в лабораторной практике питательных сред в процессе работы употреблялся агар следующего состава: 20% картофельного отвара, 100,0 пептона 0,5 г, агар-агара 2,0 г.

Зоны нитрификации

Обычно указывается, что Nitrosocystis распространен преимущественно в лесных почвах, и поэтому исследования были начаты с посевов этих почв. В моем распоряжении было большое количество образцов лесных почв, взятых как в лиственных, так и в хвойных лесах различных мест Союза. Однако посев 25 образцов не дал ожидаемых результатов — вокруг частиц почвы не появилось зон растворения мела, и реакция кусочков геля на нитриты была отрицательной. С целью проверить пригодность гелевых пластинок для культивирования была посеяна почва, привезенная из Киргизии и взятая там в Карагачевой роще около города Фрунзе. Через 20 дней вокруг комочков почвы появились совершенно прозрачные зоны с резкими границами. Они постепенно увеличивались и достигли в диаметре 5—10 мм. Весь мел вокруг частиц почвы был полностью растворен (рис. 1). Невооруженным глазом было видно, что вся поверхность обнаженного геля была покрыта скудным желто-коричневым налетом, который легко снимался петлей. При малом увеличении микроскопа видно, что весь участок геля, свободный от мела, покрыт шаровидными цистами желтоватого цвета. Чем ближе к частице почвы, тем они крупнее, но количество их сравнительно невелико. Наоборот, по мере приближения к краям зоны цист гораздо больше, однако они становятся мельче. Общее впечатление от этой картины дает рис. 2 и 3. Обычно на пластинке кремнекислого геля расположено 25—35 комочков почвы, и многие из этих комочков окружены зоной растворения мела. Если такая зона возникает, то в ней постоянно обнаруживаются цисты. Обнаженных участков геля без цист нет совершенно. Реакция на нитриты с кусочками геля, взятыми из этих зон, резко положительная, в то время как количество

аммиака постепенно уменьшается. Таким образом образование зон связано с процессом нитрификации.

Микроскопия цист убедила меня в том, что эти плодовые тела принадлежат миксобактериям из рода Sorangium. Плодовые тела имели большое сходство с теми зооглеями, цистами и склероциями, которые описывали в своих работох Romell и Виноградские у новых ви-

Рис. 1. Зоны растворения мела вокруг частиц почвы (зоны нитрификации)

дов нитрифицирующих бактерий, Стало совершенно очевидным, что Nitrosocystis относится к миксобактериям. Интересы рациональной систематики микроорганизмов побуждают меня не выделять эту груп-

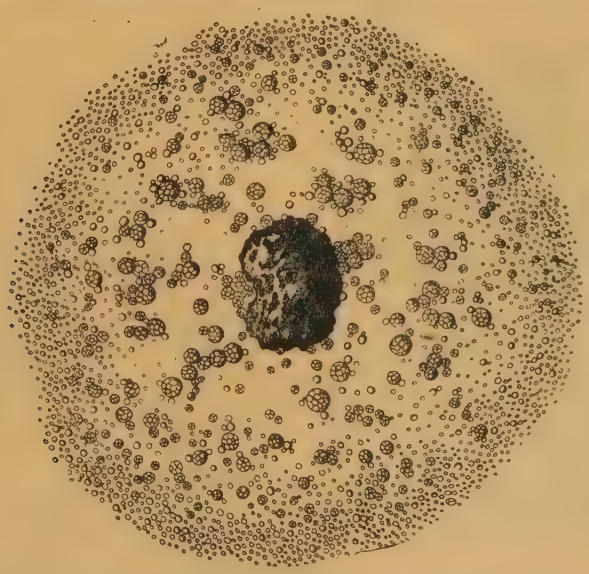


Рис. 2. Плодовые тела миксобактерии Sorangium в зонах нитрификации. В центре комочек почвы. 15 ×

пу организмов в отдельный род, а объединять с родственными видами из класса Myxobacteriales. Исходя из этого, я описываю этот вид Sorangium так, как это принято при изучении миксобактерий.

Его плодовые тела имеют округлую форму, бледножелтого цвета

и достигают 18—40 μ в диаметре. Каждое плодовое тело состоит из скопления цист, и поэтому оно слегка напоминает тутовую ягоду

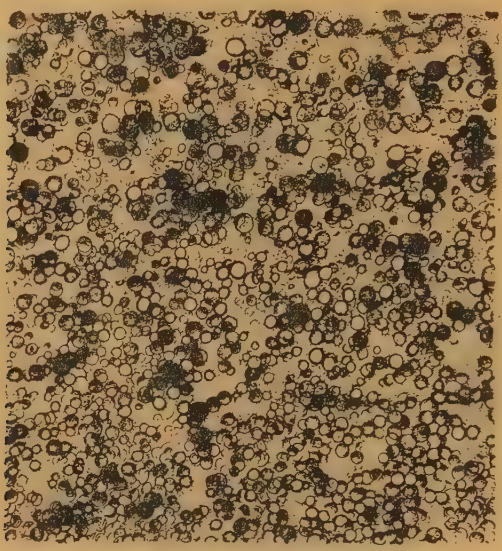


Рис. 3. Участок геля, на котором полностью растворен мел. Чем крупнее плодовые тела миксобактерии, тем реже они расположены. 95×

или малину (рис. 4 и 5). Отдельные цисты округлой или овальной формы 5,5—7,5 μ величины, и благодаря тому, что они сдавливают

Рис. 4. Крупные плодовые тела Sorangium, состоящие из небольших цист

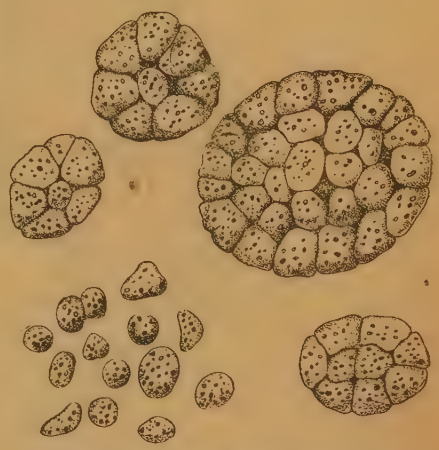


Рис. 5. Плодовые тела Sorangium и отдельные мелкие цисты, из которых они образуются

друг друга, они имеют в плодовом теле полигональные очертания. Цисты в свою очередь состоят из мелких круглых или многоугольных небольших цист, которые являются как бы исходным структур-

ным элементом (рис. 5). В этих мелких цистах содержатся короткие палочки, и поэтому содержимое цист кажется зернистым. Плодовое тело не имеет плотной оболочки, и если растереть его между покровным и предметным стеклом, оно легко распадается на отдельные мелкие цисты. Количество слизи, находящейся между клетками и в плодовом теле, сравнительно невелико, но все же она, повидимому, играет роль в склеивании отдельных цист между собой.

Плодовые тела Sorangium очень хромофильны и настолько интенсивно окрашиваются основными красками, что приобретают вид темного пятна, структуру которого очень трудно разобрать Эта можно избежать, производя окраску слабыми растворами красок. Обычно я окрашивал их в течение 15—30 сек. раствором метиленовой синьки в концентрации 1 : 10 000.

Образовавшиеся плодовые тела Sorangium, как и у других миксобактерий, представляют собой покоящиеся стадии — они не размножаются, не распадаются и не прорастают на той же среде, на которой возникли. Этот факт, хорошо известный по отношению к миксобактериям, я считаю необходимым подчеркнуть, так как, описывая историю развития Nitrosocystis, иногда указывают на освобождение подвижных клеток из цист или на размножение цист путем фрагментации их содержимого. Биологическое значение цист, повидимому, заключается в их большей устойчивости к неблагоприятным внешним условиям, чем свободных вегетативных клеток. Весьма разнообразные по своей форме и окраске, плодовые тела миксобактерий способствуют сохранению вида при высушивании, инсоляции и действии других внешних факторов. Не исключена возможность, что скопления клеток в крупные цисты делают их уже недоступными для Protozoa, питающихся микробами.

Обнаруживающиеся в зонах нитрификации плодовые тела Sorangium имеют сложную структуру, но в общем характер плодового тела у них такой же, как и у других уже хорошо известных миксобактерий, относящихся к роду Sorangium.

О миксобактериях, развивающихся в зоне нитрификации

Появление плодовых тел Sorangium в зонах растворения мела, а также наблюдающееся при этом окисление аммиака и накопление нитритов позволило высказать два предположения. Можно было думать, что среди миксобактерий в результате дивергенции произошли аутотрофные виды, физиология которых идентична физиологии классического возбудителя нитрификации — Nitrosomonas. Учитывая сложность организации миксобактерий и высокое положение, занимаемое ими в системе организмов, этот факт в теоретическом отношении представил бы большой интерес.

Далее можно было предполагать, что Sorangium относится к миксотрофным организмам и, вызывая нитрификацию, в то же время способен развиваться на обычных питательных средах.

Для решения этих вопросов налет, взятый из зон нитрификации, был посеян на чашки с картофельным агаром, т. е. средой, которая обычно употребляется в нашей лаборатории при изучении миксобактерий. Эти посевы давали рост различных микробов, однако преобладали желтые колонии одной бактерии, и они, как показали дальнейшие исследования, принадлежали к тому же виду Sorangium, который развивался в зонах нитрификации на пластинках геля. Отсев из такой колонии на картофельный агар в пробирке дал чистую культуру, а затем из нее была выделена культура из одной клетки. Перехожу к ее описанию.

Колонии. На поверхности картофельного агара возникают круглые, гладкие, слегка выпуклые колонии лимонножелтого цвета. Их

размер 0,5—1 мм, они имеют совершенно ровные края и слегка блестящую поверхность. Колонии мягкой, несколько слизистой консистенции и легко снимаются петлей. Как обычно, миксобактерии размножаются медленнее, чем другие бактерии, поэтому при рассевах из зон нитрификации колонии Sorangium появляются позже и, следовательно, они гораздо меньше по величине, чем колонии остальных бактерий.

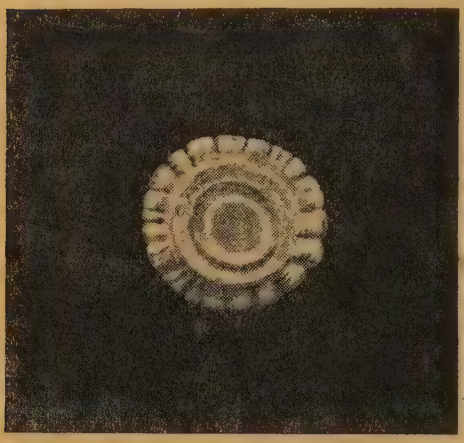


Рис. 6. Гигантская колония Sorangium на картофельном агаре. $1^1/_2\times$

При характеристике миксобактерий Имшенецкий и Солнцева [1] предложили описывать гигантские колонии, так как их структура дает очень много для систематики. С этой целью в чашки Петри с картофельным агаром был нанесен в пяти местах посевной материал и чашки выдерживались в термостате при 25° в течение 45 дней. Спустя этот срок на чашках выросли большие круглые колонии, достигавшие 14—18 мм в диаметре. Отдельные гигантские колонии плоские, гладкие, лимонножелтые с фестончатым краем (рис. 6). Они имеют концентрическое строение, и в них можно различать три зоны. Центр — серовато-желтый, матовый, слегка приподнятый, имеет 3—6 мм в диаметре. За ним следует влажная блестящая средняя зона шириной в 3—4 мм желтого цвета. Эта зона довольно резко отграничена как от центра, так и от наружной третьей зоны. В наружной части средней зоны имеются желтые узелки, залегающие в толще колонии и хорошо видимые невооруженным глазом при проходящем свете. Это плодовые тела, видимые без увеличения. Наружная зона бледножелтого цвета и постепенно уплощается к краю колонии. В ней заметна незначительная радиальная складчатость, соответствующая фестончатому краю колонии.

При микроскопии колонии слегка желтоватого цвета. В центре колонии сквозь мелкозернистый матовый фон просвечивают плодовые

Рис. 7. Разрез через гигантскую колонию Sorangium. Видны плодовые тела (схематично)

тела, но они видны не отчетливо. В противоположность этому в средней зоне хорошо видны округлые плодовые тела, имеющие форму тутовой ягоды. Они достигают 35—55 μ в диаметре, и особенно крупные тела видны на границе между средней и наружной зоной, что соответствует желтым «узелкам» и «зернам», видимым в колонии невооруженным глазом. Следуя от наружного края средней зоны к периферии колонии, размер плодовых тел постепенно уменьшается, и в наружной зоне видны плодовые тела, диаметр которых равен только 4,5—10 μ. Таким образом образование плодовых тел у описываемого Sorangium подчиняется общей для всех миксобактерий закономерности — чем ближе к центру, т. е. чем старше участки колонии, тем крупнее плодовые тела. Самые периферические части наружной зоны вообще не имеют плодовых тел. Представление о структуре гигантской колонии

Sorangium дает рис. 7, на котором схематически изображен разрез колонии.

Я умышленно остановился на подробном описании морфологии колонии. Это вызвано тем, что существуют миксобактерии, необычайно похожие на обычные неспороносные бактерии (например Flavobacterium), и только изучение старых гигантских колоний, где уже началось образование плодовых тел (в молодых колониях они могут отсутствовать совершенно) позволяет правильно определить микроорганизм.

Сравнительное изучение формы и строения плодовых тел и цист, возникающих в зонах нитрификации на геле и появляющихся в гигантских колониях на картофельном агаре, не оставляет никаких сомнений в том, что в обоих случаях развивается один и тот же вид миксобактерий. Это подтверждается также тем, что при посевах налета из зон нитрификации на картофельный агар вырастают почти исключительно колонии описываемого Sorangium.

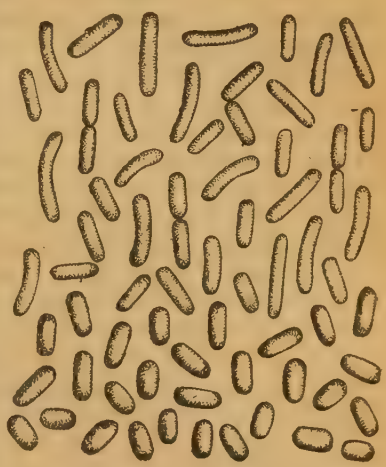


Рис. 8. Образование покоящихся форм у Sorangium. Постепенное укорочение и утолщение вегетативных клеток

Морфология клеток. Вегетативные клетки изолированной миксобактерии имеют форму тонких, прямых или слегка дугообразно изогнутых палочек с загругленными концами. Их содержимое гомогенное матовое, и, повидимому, благодаря необычайно тонкой оболочке клетки миксобактерии лишены того блеска, который имеют истинные бактерии. Клетки Sorangium плохо воспринимают основные и кислые краски, что, возможно, связано с образованием слизи. Окрашиваются они бледно, и для того, чтобы получить удовлетворительные препараты, необходимо их окрашивать основными красками в течение 15—30 минут. Клетки обычных бактерий могут быть интенсивно окрашены гораздо скорее. Таким образом, различное преломление света клетками и различное отношение к окраске позволяют с известной долей вероятности дифференцировать истинных бактерий от миксобактерий. Эти особенности необходимо подчеркнуть, так как в дальнейшем на них придется ссылаться.

В течение 48 часов вегетативные клетки Sorangium довольно длинные — их величина 0,45—0,55 $\mu \times$ 2,4—2,7 μ. Они быстро размножаются перетяжкой, и разделившиеся особи видны в препарате, причем дочерние клетки нередко располагаются под углом. Однако уже в 48-часовых культурах начинают встречаться более толстые и короткие формы. Сжатие и укорочение клеток при одновременном их утолщении, т. е. процесс, столь характерный для жизненного цикла миксобактерий, все прогрессирует, и в 3—4-суточных культурах уже почти все клетки превращаются в короткие палочки с закругленными концами 0,9—1,25 $\mu \times$ 0,85 — 1,45 μ величины. Эти укороченные формы покоя уже не размножаются, их содержимое несколько более плотное, чем вегетативных клеток. Прогрессирующее сжатие клеток Sorangium изображено на рис. 8. Вегетативные клетки и покоящиеся формы весьма отличаются в морфологическом отношении, как это видно при сравнении клеток из культур различного возраста. При микроскопии окрашенных препаратов обращает на себя внимание, что средняя часть покоящихся клеток Sorangium остается почти неокрашенной и имеет вид узко светлой полоски. Концы клеток окра-

шиваются при этом довольно интенсивно, и такая клетка может быть ошибочно принята за парно-расположенные кокки.

Сократившиеся клетки Sorangium представляют собой формы покоя, которые уже не размножаются. Они группируются, образуя скопление, в которых происходит формирование мелких округлых, трехугольных или полигональных цист. Соединяясь друг с другом, они образуют скопления, которые и являются плодовыми телами, уже описанными выше.

Подвижность. Клетки Sorangium оживленно подвижны. В культурах на жидких средах клетки быстро перемещаются в поле зрения в различных направлениях. Если сделать висячую каплю, внести в нее небольшое количество посевного материала и выдержать препарат в течение 24 часов при 25°, то при микроскопии капли видно, как размножившиеся клетки оживленно двигаются в поле зрения микроскопа. Поместив стекло с висячей каплей на подогревательный столик и повысив температуру до 33—35°, можно усилить еще более эту подвижность. Клетки обладают поступательным движением, иногда переворачиваются на одном месте или, зацепившись одним концом за стекло, вращаются вокруг этой точки. Движение клеток Sorangium гораздо быстрее, чем у ряда других миксобактерий, например Myxococcus, Polyangium или Melittangium. Обнаружить жгутики у клеток Sorangium путем окраски по Лефлеру или с помощью электронной микроскопии не удается. Следовательно, и эта оживленная подвижность обусловлена секрецией слизи, т. е. носит реактивный характер, как у всех миксобактерий.

Рост на питательных средах. Описываемый вид Sorangium хорошо развивается на обычных питательных средах. Так, она растет на мясопептонном бульоне и агаре, сусле и сусло-агаре, картофельном отваре и кусочках картофеля. На плотных средах Sorangium дает обильный гладкий, блестящий, лимонножелтый налет. Развитие миксобактерий на жидких средах сопровождается появлением в среде незначительного осадка, мути и узкого пристеночного кольца. Пленки нет.

На среде Гетчинсона миксобактерия не разлагает клетчатки, а на средах с крахмалом не дает гидролиза крахмала. Развитие на мясопептонной или картофельной желатине прекрасное, но желатина не разжижается. Эти данные были подтверждены следующим опытом. Четырехдневная жидкая культура Sorangium в количестве 3 см³ была добавлена к 6 см³ 8% желатина. После 3-часового пребывания при 25° была произведена при 30° вискозиметрия желатины, к которой была добавлена культура. При этом оказалось, что вязкость желатины не изменилась и, следовательно, протеиназы в культуре Sorangium отсутствуют. С целью выяснить отношение миксобактерии к некоторым источникам азота были произведены посевы на среду следующего состава: KH_2PO_4 0,05 г, $MgSO_4$ 0,05 г, глюкозы 2,0 г, водопроводной воды 100 см. Различные источники азота добавлялись к этой среде в количестве 0,25%. При этом оказалось, что Sorangium хорошо развивается на среде с пептоном, но не дает роста на средах с $NaNO_2$, KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$ или альбумином. Возможно, что этот организм не усваивает некоторых из этих соединений из-за отсутствия в среде ростовых веществ.

Таким образом, изолированный из зон нитрификации Sorangium представляет собой типичную миксобактерию и развивается на общеупотребительных питательных средах. Следовательно, наше первое предположение о том, что среди Myxobacteriales существуют истинные аутотрофы, аналогичные Nitrosomonas, должно было отпасть. Оставалось другое предположение — именно возможность существования миксобактерий, относящихся к миксотрофам. Для решения этого вопроса было необходимо выяснить, способен ли Sorangium нитрифицировать.

Опыты по нитрификации. Исследования были проведены

с помощью трех методик. В первой серии опытов на поверхность кремнекислого геля, пропитанного средой для нитрификаторов и покрытого, как обычно, мелом, наносился в нескольких местах налет, взятый из культур Sorangium на картофельном агаре. Чашки выдерживались в термостате при 25° в течение месяца.

В другой серии опытов посев клеток миксобактерий был произведен в колбы с жидкой средой для нитрифицирующих бактерий. Эти посевы также сохранялись в течение месяца.

В третьей серии были проведены «острые» опыты по нитрификации с взвесью клеток миксобактерий. Для этого культура Sorangium, выросшая на чашках Петри с картофельным агаром, смывалась стерильной водопроводной водой, и густая взвесь клеток переносилась в жидкую среду, обычно применяемую для культивирования нитрифицирующих бактерий. Колбы помещались в термостат на 24 часа, а затем с содержимым колб производились реакции на аммиак и на нитриты.

Все эти опыты дали отрицательные результаты. Миксобактерия не развивалась, зон растворения мела не пластинах кремнекислого геля не появлялось, и реакция на нитриты как с кусочками геля из чашек, так и с жидкой культурой всегда была отрицательной. Возникало предположение, что миксобактерия после многократных пассажей на средах, содержащих органическое вещество, необратимо теряет свою способность существовать аутотрофно. Хотя такое предположение и казалось маловероятным, я повторил опыты по нитрификации с бактериями, только что выросшими на картофельном агаре после посева налета из зон нитрификации. Как и следовало ожидать, и в этих опытах нитрификации не было.

Итак, изолированный Sorangium не может быть отнесен ни к аутотрофным, ни к миксотрофным организмам.

Симбиоз нитрификаторов и миксобактерий

Закономерное появление плодовых тел миксобактерий в зонах нитрификации, казалось бы, говорило о нитрифицирующей способности миксобактерий. Однако, как мы видели выше, чистые культуры миксобактерий не окисляют аммиака. Следовательно, условия роста для Sorangium на поверхности геля в смешанной культуре иные, чем для размножения чистой культуры этого вида. Так как Sorangium оказался типичным гетеротрофом, а питательная среда лишена органических веществ, то естественно, что синтез органического вещества мог осуществляться только нитрификаторами. Исходя из этого, я начал поиски нитрифицирующих бактерий, считая, что их развитие должно предшествовать развитию миксобактерий на пластинках кремнекислого геля. В данных условиях культивирования последовательность в развитии как бы находит свое «пространственное выражение», т. е. чем раньше размножается микроб, тем он дальше расположен от центра зоны. Поэтому микроскопии подверглись участки мела, расположенные на 0,3—0,8 мм от края зоны растворения мела. Для приготовления таких препаратов мел, взятый маленькой петлей вокруг зоны, помещался в небольшую каплю воды, нанесенную на предметное стекло, а затем препарат обрабатывался и окрашивался так, как было указано при описании методики исследований.

Микроскопия таких препаратов выясняет, что вокруг зон растворения мела, содержащих цисты Sorangium, всегда можно обнаружить клетки обычного возбудителя нитрификации Nitrosomonas. Существенно, что в этих участках гелевой пластинки обнаруживаются только нитрификаторы,— ни цист, ни клеток миксобактерий здесь еще нет. Круглые клетки Nitrosomonas видны в препарате в сравнительно небольшом количестве, и чем дальше от зоны растворения мела, тем коли-

чество их уменьшается и, наконец, клеток уже не удается обнаружить вообще. Однако даже на расстоянии 0,7 мм от края зоны нитрификации могут быть обнаружены кокковидные элементы Nitrosomonas, как это видно на рис. 9.

Морфология Nitrosomonas описывалась неоднократно, поэтому я отмечу только те его особенности, которые имеют значение в данном случае.

Клетки Nitrosomonas кокковидной формы, и мне не приходилось видеть нитрификаторов, которые, как это многие утверждают, имели бы форму палочки. Возможно, что за палочковидные элементы принимают те удлиненные формы Nitrosomonas, которые появляются перед делением кокков. В эту фазу онтогенетического развития клетки действительно приобретают форму коккобациллы, но затем они делятся на два кокка. Нитрифицирующие бактерии сильно преломляют свет, и при определенной установке тубуса микроскопа это преломление можно сделать исключительно отчетливым даже в окрашенных препаратах. Границы клеток нитрификатора резкие, и контуры кокков всегда ясно очерчены. Окрашивается Nitrosomonas основными красками весьма интенсивно, и при длительной окраске, например, метиленовой синькой, шаровидные элементы становятся черно-синими.

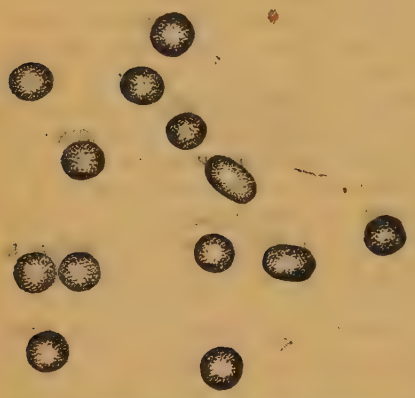


Рис. 9. Единичные клетки Nitrosomonas, обнаруженные в препарате (препарат приготовлен из мела, окружающего зону нитрификации, содержащей плодовые тела Sorangium)

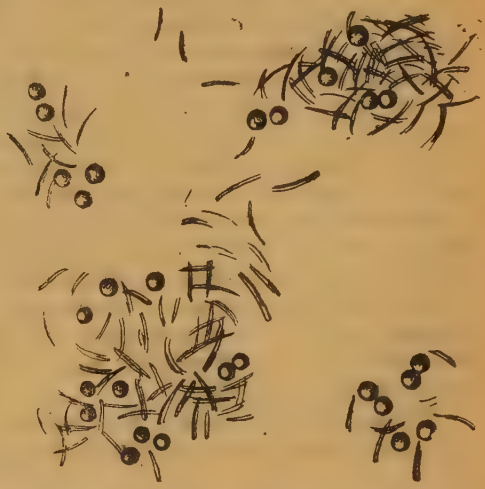


Рис. 10. Клетки Nitrosomonas, содержащиеся в скоплениях клеток миксобактерии Sorangium

В противоположность этому клетки Sorangium всегда имеют форму палочек, лежат в виде скоплений, окрашиваются бледно, не имеют резких границ и не преломляют свет.

Вернемся к микроскопии материала, взятого из зон нитрификации. Выше указывалось, что за пределами зон растворения мела обнаруживаются только клетки Nitrosomonas. У самого края зоны уже начинают встречаться клетки миксобактерий. Благодаря различной форме, структуре и окрашиваемости клеток Nitrosomonas и Sorangium их можно с уверенностью отличить в препарате. В препаратах, приготовленных из материала, взятого из зон нитрификации, нередко между клетками Nitrosomonas и миксобактерий существует самая тесная связь. В поле зрения видны небольшие группы бледноокрашенных клеток миксобактерий, в которые как бы вкраплены шаровидные клетки Nitrosomonas (рис. 10). Между скоплениями миксобактерий лежат также свободные клетки нитрификаторов. Наиболее демонстративные картины могут быть

получены при микроскопии края зоны или участков мела, непосредственно прилегающих к краю. В самой зоне нитрификации Nitrosomonas также может быть найден, но обнаружить его труднее. Это можно объяснить автолизом клеток Nitrosomonas, а также механическим «увлечением» нитрификаторов скоплениями клеток миксобактерий в процессе образования цист. Возможно, что этому способствует выделяемая миксобактерией слизь.

Описываемая последовательность в развитии двух видов бактерий подтверждается также следующим опытом. Из зоны интрификации, содержащей плодовые тела Sorangium, был взят кусочек геля и посеян в колбу с жидкой средой для нитрификаторов. Когда в культуре появились нитриты, из нее был сделан петлей в нескольких местах посев на чашки с гелем. В дальнейшем на месте посева возникли мелкие точечные зоны обнаженного геля. В меле, непосредственно примыкающем к этим зонам, были обнаружены, и в довольно большом количестве, клетки Nitrosomonas. Через некоторое время в увеличившихся зонах нитрификации появились плодовые тела Sorangium.

Таким образом Nitrosomonas с полным правом может быть назван «авангардным» микроорганизмом, т. е. аутотрофом, идущим впереди, размножающимся и накапливающим органическое вещество на пластинках геля. Затем следует гетеротрофная миксобактерия, размножающаяся за счет синтетической деятельности нитрификаторов. Желая подчеркнуть установленные мною взаимоотношения между двумя организмами, я присваиваю изолированной миксобактерии наименование Sorangium symbioticum.

Несколько замечаний о результатах исследований

Совершенно бесспорно, что при посеве некоторых образцов почвы на пластинки кремнекислого геля легко могут быть получены зоны нитрификации, в которых под микроскопом видны шаровидные цисты. Эти морфологические картины весьма близки, если не идентичны, тем картинам, которые приводились Romell, а также Виноградским и Виноградской при описании нового возбудителя нитрификации Nitrosocystis. Как показали мои исследования, чистая культура этого организма не обладает способностью нитрифицировать. Это типичная гетеротрофная миксобактерия.

Чем же в таком случае можно объяснить неправильное заключение о том, что Nitrosocystis относится к нитрификаторам?

Во-первых, переоценкой в исследованиях по нитрификации классического метода пластинок кремнекислого геля. Обычно принято считать, что растворение мела и положительная реакция на нитриты вызываются деятельностью микроорганизмов, развившихся в зоне нитрификации. Это правильно, но только по отношению к чистым культурам. В обогащенных культурах всегда возможен симбиоз и последовательное замещение одной формы другою, замещение, которое может ускользнуть от глаз наблюдателя.

Вторым источником ошибки может служить некоторое сходство морфологии клеток Nitrosomonas и миксобактерий. Объясняется это тем, что для жизненного цикла Myxobacteriales характерно сокращение вегетативных клеток и закругление их концов, которое уже происходит в сравнительно молодых культурах. Такие сократившиеся формы не всегда легко отличить от клеток Nitrosomonas. И, наконец, в третьих, это тесное сожительство, существующее между миксобактерией и Nitrosomonas. Благодаря этому в центральных, более старых, участках зоны преобладают цисты и плодовые тела миксобактерии, а клетки Nitrosomonas менее заметны.

Все эти моменты привели к тому, что вторично развивающиеся миксобактерии были описаны как новые виды нитрифицирующих бактерий.

Весьма краткое описание этих миксобактерий, приведенное в работах Romell и Виноградских, не дает мне возможности сопоставить Sorangium, характеристика которого дана в этой статье, с видами, описанными этими авторами. Судя по прекрасным фотографиям, приложенным к их исследованиям, различные виды нитрифицирующих бактерий, обозначенные как Nitrosocystis и Nitrosogloea, все относятся в Myxobacteriales, и именно к одному и тому же роду Sorangium.

Теперь рассмотрим взаимоотношения, существующие между миксобактериями и нитрификаторами на питательных средах, применяемых для культивирования нитрифицирующих бактерий. Прежде всего отметим, что связь между ними весьма тесная, и она прочно сохраняется, несмотря на многочисленные пассажи на жидкой среде или геле. Это не случайная примесь одного вида бактерий к культуре нитрификаторов. Хорошо известно, что в обогащенных культурах нитрифицирующих бактерий могут быть самые различные сопутствующие формы. Сошлюсь на исследования Stapp [8], который выделил из элективной культуры нитрификаторов три вида посторонних бактерий: Serratia offirmata, S. odiosa и Bact. tenelbum. Эти гетеротрофные виды, как любой вид бактерий, сопутствующий нитрификаторам, будет существовать только за счет последних, но в описанном мной совместном развитии нитрификаторов и миксобактерий обращает на себя внимание исключительно обильное развитие миксобактерий.

О характере этого симбиоза можно говорить на основании биологии каждого вида. Несомненно, что Nitrosomonas, как размножающийся первым, служит в дальнейшем источником органического вещества для миксобактерии. Питается ли последняя только продуктами, образующимися после гибели и автолиза клеток Nitrosomonas, или она сама способствует их гибели и лизирует их, т. е. ведет себя как паразит, этот вопрос могут решить лишь дальнейшие исследования. Отмечу, что у миксобактерий установлен паразитический образ жизни. Так, Geitler [6] описал вид, паразитирующий на водорослях, а некоторые виды миксобактерий вызывают лизис грибов (Кононенко [2]) и фитопатогенных бактерий (Солнцева [3]). По мнению Beebe [4], взаимоотношения между Myxobacteriales и другими бактериями носят скорее паразитический, чем симбиотический, характер. Таким образом, весьма возможно, что Sorangium вызывает лизис клеток Nitrosomonas.

Следует упомянуть еще о двух особенностях биологии миксобактерий, которые интересны в данном случае. Большинство из них прекрасно развивается на поверхности плотных сред, причем они активно перемещаются по субстрату и захватывают все новые и новые участки питательной среды. Следовательно, на пластинке геля они находят себе весьма благоприятные условия для развития. Существенно также то, что миксобактерии весьма нетребовательны к источникам питания и хорошо развиваются на средах, где имеются буквально следы органического вещества. Этим, повидимому, объясняется их пышное развитие в условиях симбиоза с нитрифицирующими бактериями.

С другой стороны, скопление клеток миксобактерий и образование ими слоя, содержащего слизь, возможно, предохраняет клетки Nitrosomonas от действия внешней среды. Создавая нужную влажность, миксобактерии создают благоприятные условия для деятельности нитрификаторов в их пленке.

Имеем ли мы здесь мутуалистический симбиоз или явление, близкое к паразитизму, это вопрос, который решится в будущем. Несомненно лишь, что это не случайная примесь одного вида миксобактерий к культуре нитрификаторов, а тесное сожительство хемотрофа с гетеротрофом. Не исключена возможность, что такие ассоциации существуют в природе и они могут возникнуть первично на поверхности минерального субстрата, лишенного органического вещества.

Выводы

1. На протяжении сорока лет единственным возбудителем первой фазы нитрификации считался Nitrosomonas. За последние пятнадцать лет описан ряд новых нитрифицирующих бактерий, относящихся к Nitrosocystis, Nitrosospira и Nitrosogloea. Для этих форм характерен зооглейный рост и образование цист. В чистой культуре эти организмы не были выделены.

2. Проведенные исследования подтвердили, что на пластинках кремнекислого геля вокруг комочка почвы иногда образуются зоны нитрификации, в которых обнаруживаются цисты. Форма и строение последних соответствуют плодовым телам миксобактерии из рода Sorangium.

3. Развивающаяся в зонах нитрификации миксобактерия была выделена в чистой культуре из одной клетки. Этот вид Sorangium был изучен, причем он оказался гетеротрофным и нитрификации не вызывал.

4. Присутствие плодовых тел миксобактерии на кремнекислом геле объясняется тем, что ее размножению предшествует рост классического возбудителя нитрификации — Nitrosomonas, т. е. хемотрофа, синтезирующего органическое вещество, необходимое для развития миксобактерии.

5. Между Nitrosomonas и Sorangium существуют своеобразные симбиотические взаимоотношения, сохраняющиеся после ряда пересевов на жидкой среде или кремнекислом геле. В связи с этим новый вид миксобактерии назван Sorangium symbioticum.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 19.I.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. и Солнцева Л. О миксобактериях, разлагающих клетчатку. Микробиология, т. 6, 3, 1937.
2. Кононенко Е. Лизис возбудителя винта хлопчатника Verticillium dahliae, вызываемый некоторыми миксобактериями. Микробиология т, 6, 699, 1937,
3. Солнцева Л. О лизисе фитопатогенных бактерий, вызываемом Myxobacteriales. Микробиология, т. 8, 700, 1939.
4. Beebe J. Studies on the Myxobacteria. I. Distribution in Central Jowa with description of a new species. II. The rôle of myxobacteria as bacterial parasites. Jowa State Coll. J. Sci., 15, 307, 1941.
5. Boltjes T. Untersuchungen über die nitrifizierenden Bakterien. Arch. Mikrob., 6, 79, 1935.
6. Geitler L. Ueber Polyangium parasiticum n. s. p., eine submerse parasitische Myxobacteriaceae. Arch. Protist., 50, 67, 1924.
7. Romell L. A Nitrosocystes from american forest soil. Svensk Bot. Tidskr., 26, 303, 1932.
8. Stapp C. Ueber Begleitorganismen der Nitrifikationsbakterien. Cbl. Bakt., 2. Abt., 102, 193, 1940.
9. Winogradsky S. Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. Inst. Past., 4, 213, 1890.
10. Winogradsky S. Microbiologie du Sol. Nouvelles recherches sur les microbes de la nitrification. C. R. Acad. Sci. Paris, 192, N 17, 1931.
11. Winogradsky S. Études sur la microbiologie du sol (septième mémoire). Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification (en coll. avec Winogradsky Hélène). Ann. Inst. Past., 50, 350, 1933.
12. Winogradsky H. Contribution à l'étude de la microflore nitrificatrice des boues activées de Paris. Ann. Inst. Past., 58, 326, 1937.

THE NITRIFYING BACTERIA AND MYXOBACTERIA

A. A. Imšenecki

Summary

1. For forty years Nitrosomonas has been considered as the only causative agent of the first phase of nitrification. In the course of the last 15 years a number of new nitrifying bacteria has been described and classified as Nitrosocystis, Nitrosospira and Nitrosogloea. Growth in zoogloeae and cyst production are characteristic of these forms. The organisms have not been isolated in pure culture.

2. Investigation has confirmed that on silica gel plates zones of nitrification arise sometimes around soil clots, and cysts are detected within these zones. The shape and structure of these cysts correspond to those of fruiting-bodies of a myxobacterium belonging to the genus Sorangium.

3. A pure culture of the myxobacterium developing in the zones of nitrification was isolated proceeding from one cell. This species of Sorangium was studied and was found to be heterotrophic and unable to produce nitrification.

4. The presence of the fruiting-bodies of this myxobacterium on the silica gel is explained by the fact that its growth is preceded by that of the classical causative agent of nitrification of Nitrosomonas, which being a chemotroph synthetizes the organic substance necessary for the development of the myxobacterium.

5. Symbiotic relations of a kind exist between Nitrosomonas and Sorangium which persist after a number of transfers in liquid media or on silica gel plates. In connection with this the new species of myxobacteria has been given the name of Sorangium symbioticum.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

РОСТОВЫЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СТРОЕНИЕ И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ

М. Н. Мейсель, Н. П. Трофимова и *Н. П. Лисовская*

В настоящее время все больше и больше выясняется значение условий существования культуры микроорганизмов и состава питательной среды для формирования морфологических и функциональных особенностей клеток. На факультативных аэробов и анаэробов определяющее влияние оказывает степень аэрации [1, 2]. Наличие тех или иных расщепляемых и ассимилируемых продуктов существенно для появления и усиления деятельности определенных энзиматических систем. Характер азотистого питания, солевой состав среды, накопление продуктов обмена веществ — все это накладывает отпечаток на структуру клеток и их биологическую активность [5, 6, 7]. Большая часть этих изменений находится в пределах физиологической пластичности данного вида, лишь иногда переходя в область патологических состояний. Выяснение пределов и характера такой морфологической и физиологической пластичности существенно как для понимания факторов, участвующих в формировании функционально-морфологического облика микробной клетки, так и для практического поддержания культур с нужными нам свойствами.

Данная работа представляет собою опыт выяснения особенностей функционально-морфологического влияния на микроорганизмы так называемых ростовых веществ, являющихся основными компонентами биоса. Wildiers [12], основоположник учения о биосе, рассматривал биос как вещество, или совокупность веществ, действующих одновременно на размножение и на брожение. Лишь впоследствии, с расчленением биоса на отдельные компоненты, стали различать вещества, активирующие рост, размножение, брожение и т. д.

Ростовой эффект является результатом многочисленных процессов, приводящих в самовоспроизведению элементов клеточного протопласта, катализируемых веществами биоса. Более чем вероятно, что эти вещества в какой-то мере входят в состав клеточных структур. Влияя на разнообразные звенья обмена, выступая то как компоненты определенных ферментных систем, то как факторы, влияющие на общий окислительно-восстановительный режим клетки, то как составная часть микроскопических клеточных структур, ростовые вещества обладают многообразными точками приложения. Они могут действовать на ростовые реакции непосредственно, усиливая синтез веществ протопласта или лишь в комбинации с другими факторами, и, что особенно интересно, в ряде случаев не давать ростового эффекта, а активировать иные стороны клеточной жизнедеятельности. Ростовые вещества оказывают заметное морфогенетическое влияние на микробную клетку, на ее структуру, стойкость протопласта, характер и количество включений и запасных веществ. Все это заставляет значительно расширить понятие «ростовое вещество». По этой же причине нас не может сейчас удовлетворять характеристика ростовых веществ только по ростовому эффекту как в общем учении о витаминах, так особенно в микробиологии, где объект и процессы значительно более доступны детальному анализу и могут служить прекрасной моделью для исследования в неосложнен-

ных условиях. В этой работе нами исследованы как более простые, так и более сложные взаимоотношения между микроорганизмами и экзогенными для них ростовыми веществами (случаи ауксогетеротрофии).

Простой тип ауксогетеротрофии

Грибок Endomyces Magnusii представляет собою очень удобный объект для анализа сравнительно простых взаимоотношений ростовых веществ. Он нуждается в получении извне только двух из них: биотина и витамина B_1. На искусственной питательной среде без ростовых веществ Endomyces Magnusii развивается крайне медленно и рост его постепенно затухает в последующих пересевах. Наличие в среде витамина B_1 значительно активирует размножение этого организма. В присутствии одного биотина размножение также отчетливо активируется. Однако особенно сильно увеличивается нарастание культуры, когда в среде одновременно имеются биотин и витамин B_1. Урожай при этом достигает нормального уровня, присущего этому организму на обычной сусло-агаровой среде.

Рассмотрим особенности физиологии и морфологии Endomyces Magnusii при культивировании на искусственной среде с ростовыми веществами (среда Ридер или видоизмененная среда Ридер с гликоколлом). Культуры, выросшие на среде с витамином B_1 (от 0,5 до 12 мг на литр), обнаруживают резкий сдвиг в сторону брожения [3, 4]. Особенно существенно, что этот сдвиг происходит даже в абсолютно аэробных условиях (например, при развитии на агаровой среде). На табл. 1 приводится характеристика брожения и поглощения кислорода у таких культур [1].

Таблица 1

Функциональная характеристика Endomyces Magnusii при развитии в аэробных условиях

Среда	Q_{O_2}	$Q^{O_2}_{CO_2}$	Урожай с 10 чашек Петри в г
Ридер — гликоколл агар	30	65	0,9
» + витамин B_1	20	—	0,5
» + биотин	33	18	1,25
» + витамин B_1 + биотин			

Цитологически, как уже отмечалось ранее [3], такие культуры имеют резко выраженный бродильный характер (рис. 1, *А*). Бродильный тип отличается более крупными размерами клеток, увеличенными ядрами и накоплением в больших количествах гликогена и волютина. Особенно типично изменение хондриосомного аппарата. Отдельные хондриосомы резко гипертрофируются, превращаясь в крупные жгутоподобные образования, перемещающиеся к периферии клетки. Такое состояние культуры, обладающей, несмотря на развитие в аэробных условиях, отчетливой бродильной характеристикой как в физиологическом, так и в морфологическом отношении, мы склонны рассматривать как проявление B_1-гипервитаминоза. При этом интенсивность поглощения кислорода существенно не изменяется и активирование размножения, вызываемое витамином B_1, сопровождается лишь увеличением интенсивности брожения.

---

[1] В таблицах, приводимых в этой статье, приняты следующие обозначения: Q_{O_2} — количество кислорода в мм³, поглощенного за 1 час на 1 мг сухого вещества; $Q^{O_2}_{CO_2}$ — количество углекислоты в мм³, выделенной за 1 час на 1 мг сухого вещества в аэробных условиях; $Q^{N}_{CO_2}$ — то же в анаэробных условиях. Урожай определялся по сухому весу дрожжей, полученных с 200 см³ жидкой среды или с 10 чашек Петри (стандартного диаметра) агаровой среды.

Рис. 1. Endomyces Magnusii, развивавшийся в аэробных условиях на среде Ридер. Прижизненная окраска зеленым янусом и нейтральной красной. *A*—с витамином B_1; *B*—с биотином; *C*—с биотином и витамином B_1. Серые гранулы—волютин, черные — хондриосомы

Если наряду с витамином B_1 в питательной среде присутствует биотин[1] (1—2 γ на литр), картина резко изменяется. Биотин в значительной мере нивелирует бродильный сдвиг, вызываемый витамином B_1 в аэробных условиях, еще более активируя, вместе с тем, размножение нашего организма. Интенсивность поглощения кислорода в этом случае может повышаться, брожение, однако, сильно редуцируется, достигая нормального для аэробно-развивающейся культуры уровня. При увеличении концентрации биотина аэробное брожение может полностью тормозиться. Цитологически такая культура состоит из более мелких клеток с тонкими палочковидными или зернистыми хондриосомами, имеет мало волютина и не содержит гликогена (рис. 1, *C*). Таким образом биотин снимает не только функциональные, но также морфологические признаки бродильного сдвига в культуре Endomyces Magnusii. Следует отметить, что аккумуляция витамина B_1 культурой из среды, отчетливо идущая в присутствии этого витамина, не подавляется биотином.

Еще более удивительные результаты получаются в том случае, когда в питательной среде из ростовых веществ присутствует только биотин. Даже будучи один, он сильно активирует нарастание культуры. Однако такая культура, развивающаяся в аэробных условиях, не обладает способностью к брожению (см. табл. 1). Цитологические исследования показывают, что эта культура состоит из округлых клеток с вакуолизированной цитоплазмой, почти не содержащих волютина и полностью свободных от гликогена. Уже в однодневной культуре встречаются дегенерирующие клетки, с измененной протоплазмой, отстающей от клеточных оболочек (рис. 1, *B*). Количество таких ненормальных и отмирающих клеток с каждым днем все увеличивается, и через несколько дней большинство клеток оказывается в состоянии резкого некробиоза. Так как на макроскопическом виде культуры эти изменения не сказываются, то при учете только урожая и поверхностном наблюдении за культурой может создаться ложное представление о вполне благополучном развитии организма. Между тем не подлежит сомнению, что, несмотря на активное размножение, культура уже вскоре становится биологически неполноценной, резко страдающей от недостатка второго необходимого ей ростового вещества — витамина B_1. Имеются все основания рассматривать этот случай как проявление авитаминоза B_1. Это состояние, повидимому, усугубляется активирующим размножение воздействием биотина, так как чем энергичнее размножается культура при недостатке одного из ростовых веществ, тем резче выявляется этот недостаток. При энергичном размножении быстрее исчерпываются те небольшие запасы витамина, которые могли быть в клетках, и культура односторонне стимулируемая биотином, становится все менее полноценной. Это яркий пример отрицательного влияния одностороннего несбалансированного воздействия ростового вещества. Один из нас (Мейсель) неоднократно наблюдал быструю дегенерацию культур микроорганизмов при активировании их развития на неполноценной среде, в то время как на такой же среде медленно развивающаяся культура не подвергается столь быстрому некробиозу.

Если мы теперь обратимся к тому, как складываются взаимоотношения между ростовыми веществами при развитии культуры Endomyces Magnusii в условиях брожения (на жидкой питательной среде), то, рассмотрев табл. 2, придем к заключению, что в этих условиях биотин действует гораздо мягче и не выступает таким ярким регулятором для витамина B_1, как при развитии культуры в аэробных условиях.

Биотин и витамин B_1 являются мощными факторами, регулирующими строение и функции Endomyces Magnusii. Ни одно из испытанных нами других ростовых веществ, прибавленных по фону биотина или ви-

[1] Biotin concentrate S. M. A. Corporation, любезно предоставленный нам директором Союзвитаминпрома Г. Н. Лебедевым.

Таблица 2

Функциональная характеристика Endomyces Magnusii при культивировании в условиях брожения

Среда	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$
Ридер — гликоколл агар	—	—
» + витамин B_1	17	75
» + биотин	45	30
» + витамин B_1 + биотин	26	55

тамина B_1, как например, пантотен, ниацин, пиридоксин, парааминобензойная кислота, не смогли существенно изменить определяющее воздействие этих основных для развития нашего грибка факторов.

Организмы с более сложной ауксогетеротрофией

Сахаромицеты принадлежат к числу организмов с более сложными потребностями в ростовых веществах. Их нормальное размножение не может быть полностью воспроизведено на искусственных питательных средах, даже содержащих все известные ростовые вещества. Прибавление к таким средам дрожжевого или печеночного экстракта неизменно дает значительное увеличение урожая (на 50—100%). Тем более должна различаться физиологическая характеристика этих организмов вследствие отсутствия в среде тех или иных ростовых веществ. Взаиморегулирующее действие многих биокатализаторов, участвующих в обмене этих организмов, создает крайне пеструю картину в их реакциях. Эти особенности возникли, повидимому, в результате приспособления сахаромицетов к существованию в органической среде весьма сложного состава. Кроме того, большинство сахаромицетов приобрело способность к энергичному развитию в анаэробных условиях, требующему дополнительных приспособительных механизмов.

В этой статье мы ограничимся рассмотрением только некоторых общих закономерностей реакции сахаромицетов на ростовые вещества.

Для Saccharomyces cerevisiae XII расы основными ростовыми веществами на среде Ридер являются биотин, пантотен [1] и витамин B_1. Без

Таблица 3

Физиологическая характеристика Saccharomyces cerevisiae XII расы

Среда	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N}$	Урожай с 200 см³ среды в г
Культура на жидкой среде				
Ридер — гликоколл				
» + биотин + пантотен + витамин B_1 .	50	320	410	0,22
» + биотин + витамин B_1	15	170	196	0,14
» + биотин	5	90	96	0,06
Культура на агаровой среде				
Ридер — гликоколл агар				
» + биотин + пантотен + витамин B_1 . .	73	135	264	0,46
» + биотин + витамин B_1	47	125	268	0,25
» + биотин	30	112	193	0,08

Примечание. На литр среды биотина 1 μг, пантотена 5 мг, витамина B_1 10 мг.

[1] Пантотеновокислый натр, синтезированный и любезно предоставленный нам проф. О. Ю. Магидсон.

биотина рост культуры столь ничтожен, что трудно собрать материал для исследования. В табл. 3 сведены данные о дыхании и брожении Saccharomyces cerevisiae, развивавшегося на жидкой и твердой питательных средах с ростовыми веществами.

Табл. 3 снова подтверждает большое значение условий культивирования для фукциональной характеристики дрожжевых организмов. Решающая роль принадлежит условиям аэрации. Основное зависит от того, развивалась ли культура в условиях брожения или при обильном доступе воздуха. В первом случае организмы обладают более высоким брожением и пониженной интенсивностью поглощения кислорода; в условиях обильной аэрации развивается культура с более высокой потребностью в кислороде и со сниженной интенсивностью брожения. Далее, обращает на себя внимание гораздо меньшая разница между величинами анаэробного ($Q^{N}_{CO_2}$) и аэробного брожения ($Q^{O_2}_{CO_2}$) у культуры, развивавшейся в условиях брожения, по сравнению с культурой аэробного типа. Наконец, что особенно интересно, с уменьшением набора необходимых ростовых веществ падает не только урожай, но и функциональная активность культуры. В опыте на микробродильном приборе, где концентрация дрожжей значительно выше (4%), чем в аппарате Варбурга и где, вследствие этого, создаются более анаэробные условия, эта закономерность выступает еще отчетливее (табл. 4).

Таблица 4

Интенсивность брожения и размножения Saccharomyces cerevisiae XII расы

Среда	$Q^{O_2}_{CO_2}$	Урожай с 10 чашек Петри в г
Ридер — гликоколл агар + биотин + пантотен + витамин B_1 + дрожжевой автолизат	198	0,82
» + биотин + пантотен + витамин B_1	170	0,4
» + биотин + пантотен	136	0,22
» + биотин	84	0,06

Примечание. На литр среды биотина 1 μг, пантотена 5 мг, витамина B_1 10 мг, дрожжевого автолизата 5 см³

Последовательное выключение ростовых веществ приводит к очень сильному падению размножения и значительно менее резкому снижению интенсивности брожения: одна и та же тенденция, но различно количественно выраженная. Для формирования бродильной функции у Saccharomyces cerevisiae XII расы особое значение имеет витамин B_1 и пантотен; они же весьма существенны и для размножения. Эти данные согласуются с результатами Вильямса и его сотрудников [9, 11].

Возникает естественный вопрос, как изменяется морфология этого организма в зависимости от условий культивирования. Аэробное и анаэробное развитие накладывают резкий отпечаток на структуру клеток. Изменения идут в том же направлении, как и у Endomyces Magnusii. Возникают дыхательный и бродильный типы клеток [2]. На фоне этих резких структурных отличий отчетливо выявляются особенности, связанные с наличием тех или иных ростовых веществ. Если считать морфологию клеток на естественных питательных средах нормальной и типичной, то на искусственных средах, даже с полным набором ростовых веществ, клетки имеют значительно более округлую форму и уплотненную цитоплазму. Присутствие избыточного количества витами-

на B_1 ведет, как правило, к некоторму удлинению клеток. Биотин и биотин с пантотеном, не будучи дополнены другими ростовыми веществами, способствуют появлению клеток неправильной формы и росту конгломератами (рис. 2, *B*). Образующиеся почки не отделяются от материнских клеток, нередко появляются промицелиальные выросты или каналы между клеткой-почкой и клеткой-матерью. Эти отклонения, повидимому, связаны с каким-то страданием оболочки. Нередко удается наблюдать необычное образование перегородок, не свойственных дрож-

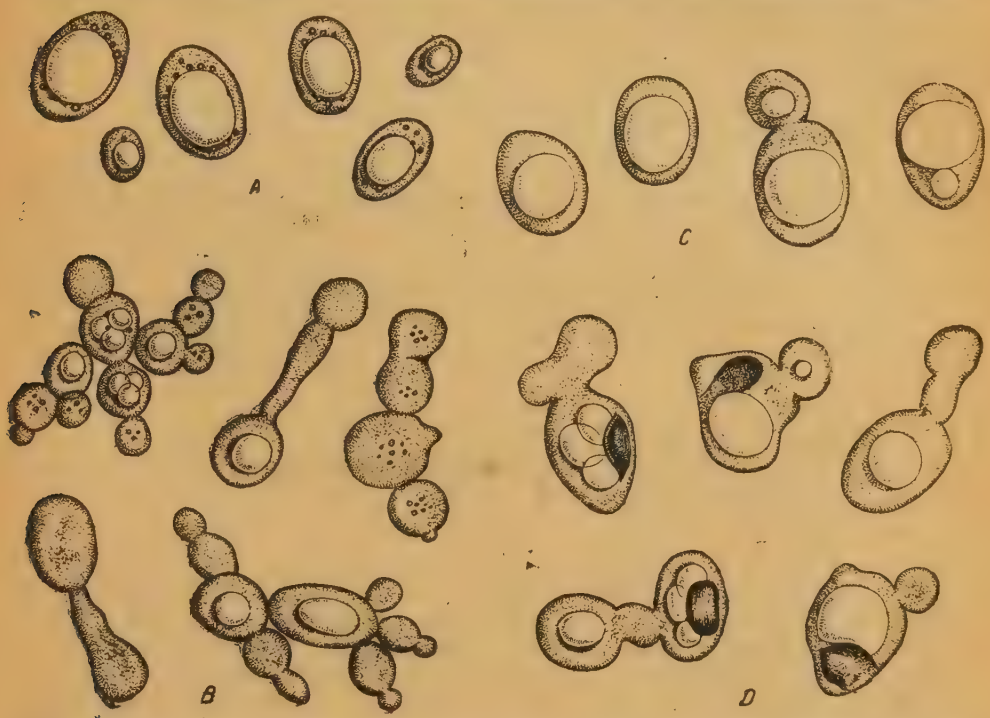


Рис. 2. Морфология дрожжевых клеток в зависимости от питательной среды. *A* — Saccharomyces cerevisiae на сусло-агаре; *B* — то же, но на Ридер-агаре с биотином; *C* — Saccharomyces fragilis на Ридер-агаре с биотином, пантотеном, ниацином и витамином B_1; *D* — то же, но на Ридер-агаре с ниацином и витамином B_1

жам этого рода. Существенно, что на средах, содержащих из ростовых веществ только биотин, наблюдается рано наступающее отмирание значительной части клеток (иногда до 50%). Добавление витамина B_1 и пантотена повышает стойкость культуры и уменьшает процент мертвых клеток. На жидких средах биологическая неполноценность культуры при недостаточном снабжении ростовыми веществами сказывается еще резче; в этих условиях витамин B_1 вполне отчетливо повышает устойчивость дрожжевых организмов. Эти факты лишний раз подчеркивают необходимость микроскопических исследований для суждения о физиологическом значении ростовых веществ. Одни определения интенсивности обмена веществ без микроскопического анализа культур могут привести к ложным выводам. На эту сторону дела, к сожалению, не обратили внимания Burk, Winzler и Vigneaud [8].

Перейдем к краткому рассмотрению функциональной характеристики Saccharomyces uvarum. Этот организм требует для своего развития инозита. Без него размножения не происходит. Вторым дополнительным фактором является биотин. Витамин B_1 на размножение Saccharomyces uvarum влияния не оказывает, хотя он несколько и усиливает аэробное брожение и поглощение кислорода (табл. 5).

Исключение биотина из состава питательной среды резко снижает

Таблица 5

Функциональная характеристика Saccharomyces uvarum

Среда	Q_{O_2}	$Q^{O_2}_{CO_2}$	$Q^{N}_{CO_2}$
Ридер — гликоколл + биотин + инозит + витамин B_1	51	257	274
» + биотин + инозит	40	225	260

Примечание. На литр среды биотина 1 μг, инозита 10 мг, витамина B_1 10 мг.

урожай Saccharomyces uvarum, лишь незначительно уменьшая интенсивность брожения (табл. 6).

Таблица 6

Брожение и размножение Saccharomyces uvarum

Среда	$Q^{O_2}_{CO_2}$	Урожай с 10 чашек Петри в г
Ридер — гликоколл агар + инозит + биотин + витамин B_1 .	100	0,4
» + инозит + витамин B_1	88	0,16

Отсутствие биотина в питательной среде не влияет существенно и на морфологию клеток. Это указывает на способность Saccharomyces uvarum удовлетворять часть своей потребности в биотине путем его синтеза. Таким образом недостаток биотина ограничивает только размножение клеток, не влияя существенно на остальные стороны их жизнедеятельности.

Другой тип взаимоотношений между ростовыми веществами и функционально-морфологической структурой клеток наблюдается у Saccharomyces fragilis. Этот организм, как и все принадлежащие к группе сбраживающих лактозу, нуждается в первую очередь в получении никотиновой кислоты (Rogosa [10]). Второе место по ростовому эффекту занимает биотин, третье место — пантотен и витамин B_1. Наши исследования показали, что у этого дрожжевого организма интенсивность брожения весьма закономерно падает с последовательным выключением

Таблица 7

Брожение и размножение Saccharomyces fragilis

Среда	$Q^{O_2}_{CO_2}$	Урожай с 10 чашек Петри в г
Ридер — гликоколл агар + ниацин + биотин + пантотен + витамин B_1	120	0,5 за 24 часа
» + ниацин + биотин + пантотен .	98	0,45 » 24 «
» + ниацин + биотин	74	0,12 » 24 «
» + ниацин + витамин B_1	56	0,12 за 48 час.

Примечание. На литр среды биотина 1 μг, ниацина 5 мг, пантотена 5 мг, витамина B_1 10 мг.

необходимых ему ростовых веществ (табл. 7). Однако и здесь размножение угнетается резче, чем брожение.

Недостаток пантотена и биотина сказывается и на размножении и на брожении резче, чем отсутствие витамина B_1. Культуры во всех случаях состоят из живых клеток, однако морфология клеток существенно изменяется на обедненной ростовыми веществами среде. Выключение пантотена вызывает появление угловатых, неправильной формы клеток. Лишение питательной среды биотина и пантотена усугубляет изменение клеточной морфологии: возникают клетки с неправильным почкованием, почки оказываются сидящими на вытянутых клеточных отрогах. В протоплазме многих клеток появляются оформленные блестящие включения типа недоразвитых спор (рис. 2, *D*). В вакуолях при прижизненной окраске нейтральной краской выпадают массивные гранулы волютина.

Рассмотрение экспериментального материала мы закончим некоторыми данными о Saccharomyces ellipsoideus (штамм музея института № 113). Этот штамм реагирует ростовой реакцией на биотин и пантотен (основные факторы) и на витамин B_1 (дополнительный фактор). Однако при исключении из среды витамина B_1 наш организм становится чувствительным и к отсутствию инозита (табл. 8). Этот интересный факт указывает на большую сложность взаимоотношений между ростовыми факторами. Некоторые из них могут выступать как активные агенты только в отсутствие других.

Таблица 8

Брожение и размножение Saccharomyces ellipsoideus

Среда	$Q\frac{O_2}{CO_2}$	Урожай с 10 чашек Петри в г
Ридер — гликоколл агар + биотин + пантотен + инозит + витамин B_1	225	0,55
» + биотин + пантотен + инозит	200	0,42
» + биотин + пантотен + витамин B_1	187	0,55
» + биотин + пантотен	153	0,3

Примечание. На литр среды биотина 1 мг, пантотена 5 мг, инозита 10 мг, витамина B_1 10 мг

Данные, приведенные в табл. 8, показывают, что у Saccharomyces ellipsoideus с падением энергии размножения понижается также интенсивность брожения. Клетки во всех случаях остаются живыми, и здесь, повидимому, имеет место функциональное угнетение каждой клетки в культуре. Морфологически падение функциональной активности клеток сопровождается уменьшением их размеров и редукцией хондриосомного аппарата.

Выводы

1. Для развития нормальной культуры микроорганизмов и полноценного в морфологическом и физиологическом отношениях состояния клеток необходим, помимо основных питательных компонентов среды, также полный набор ростовых веществ, не синтезируемых данным организмом. Этот набор в ряде случаев может быть шире того, который требуется даже для вполне хорошего размножения клеток. Энергично нарастающая культура может оказаться биологически неполноценной. Вследствие этого не представляется возможным судить о необходимых для организма ростовых веществах только по интенсивности размножения культуры.

2. Ростовые вещества способны взаимодействовать в клетке, то дополняя друг друга, то взаимно регулируя односторонний противоположный эффект каждого отдельно взятого фактора. Участие в регуляции интенсивности и направленности клеточных процессов является, повидимому, более общим свойством ростовых веществ, чем активирование размножения.

3. Недостаточная полнота набора ростовых веществ, нарушая взаимно регулирующее действие их, приводит к чрезмерному одностороннему активированию части клеточных функций, что способствует появлению неполноценных клеток и развитию явлений авитаминоза и гипервитаминоза. Витамин B_1 и пантотен являются важными факторами, повышающими общую стойкость клеточного протопласта даже в тех случаях, когда они не дают отчетливого ростового эффекта.

4. Регуляция интенсивности брожения в более простом случае (Endomyces Magnusii) осуществляется взаимодействием витамина B_1 и биотина. Первый даже в аэробных условиях вызывает резкое активирование брожения, создавая общий функционально-морфологический сдвиг в сторону брожения; биотин снимает этот сверх-эффект витамина B_1. В непосредственно ростовой реакции биотин и витамин B_1 действуют как синергисты.

5. В более сложных случаях (у сахаромицетов) интенсивность брожения обычно снижается при последовательном выключении ростовых веществ, однако в значительно меньшей степени, чем энергия размножения.

6. Исследованные микроорганизмы обнаружили два типа реакций на выключение в определенной последовательности ростовых веществ из среды. Один тип дает постепенное снижение как энергии размножения, так и брожения и дыхания. Другой тип, несмотря на значительное угнетение функции размножения, сохраняет на достаточной высоте брожение и дыхание.

7. Общая морфология дрожжевой клетки, степень развития ее микроскопических структур, характер почкования и отложения резервных веществ, а также накопление продуктов обмена находятся в значительной мере под влиянием ростовых веществ.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР

Получено 3. IV. 1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейсель М. Изменение хондриосом дрожжевых организмов при дыхании и брожении. ДАН, т. 20, стр. 481, 1938.
2. Мейсель М. Перестройка протопласта дрожжевых организмов в процессе брожения. Микробиология, т. VIII, стр. 381, 1939.
3. Мейсель М. Морфологические и физиологические изменения клетки под влиянием витамина B_1. ДАН, т. 29, стр. 127, 1940.
4. Мейсель М. Функционально-морфологический анализ значения витаминов для микроорганизмов. Микробиология, т. 10, стр. 649, 1941.
5. Селибер Г. и Бовшик Г. Влияние условий культивирования дрожжей на их бродильную способность. Изв. Ин-та им. Лесгафта, т. 12, стр. 63, 1927.
6. Селибер Г. и Пятова П. Влияние состава среды на образование каталазы и протеазы дрожжами. Изв. Ин-та им. Лесгафта, т. 20, стр. 105, 1937.
7. Beraud P. Influence de la nutrition azotée sur le pouvoir fermentatif d'une levûre de boulangerie. C. R. Soc. Biol. t. 131, p. 708, 1939.
8. Burk D., Winzler R. and Vincent du Vigneaud. The rôle of biotin in fermentation and the Pasteur effect. J. Biol. Chem., v. 140, N. 1, Proceed. Soc. Biol. Chem., 1941.
9. Pratt E. and Williams R. The effect of pantothenic acid on respiratory activity, J. gen. Physiol., v. 22, p. 637, 1939.
10. Rogosa M. Nicotinic acid requirements of certain yeasts. J. Bact., v. 46, 435, 1943.
11. Teaque P. and Williams R. Pantothenic acid and the utilization of glucose by living and cell-free systems. J. gen. Physiol. v. 25, p. 777, 1942.
12. Wildiers E. Nouvelle substance indispensable au développement de la levûre. La Cellule, t. 18, p. 311, 1901.

THE GROWTH FACTORS AND THEIR INFLUENCE ON THE STRUCTURE AND LIFE-ACTIVITY OF YEAST ORGANISMS

M. N. Meissel, N. P. Trofimova and *N. P. Lissovskaia*

Summary

1. Besides the essential nutrient components of the medium, a complete set of growth factors not synthetized by the microorganisms is necessary for the development of its normal culture and an adequate — in morphological and physiological respects — state of the cells composing it. This set in many cases may be even broader than the one which is needed for even a perfectly good proliferation of the cells. An energetically growing culture may prove biologically inadequate. Therefore, it appears impossible to judge of the growth factors necessary for a definite organism only by the intensity of the proliferation observed in its culture.

2. Growth factors are able to exercise an influence on each other within the cell, sometimes complementing one another, sometimes mutually regulating the one-sided and opposed effect exercised by the other, when it acts individually. Participation in the regulation of the intensity and direction of the cellular processes seems to be a more general capacity of growth factors, than activation of cell proliferation.

3. Incompleteness of the set of growth factors unsettles their mutually regulating action and leads to an one-sided superactivation of a part of the cell's functions, thus contributing to the arising of imperfect cells and to the development of the phenomena of avitaminosis and hypervitaminosis. Vitamin B_1 and pantothene are important factors which enhance the general resistance of the cellular protoplast even in those cases, where they do not produce an evident growth effect.

4. The regulation of the intensity of fermentation in the simpler case (Endomyces Magnusii) is realized with the aid of an interaction of vitamin B_1 and biotin. The first provokes a marked activation of fermentation even under conditions of aerobiosis, creating a generai functional and morphological shifting in favour of fermentation; biotin destroys this supereffect of vitamin B_1. In the immediate growth reaction biotin and vitamin B_1 act synergetically.

5. In more complicated cases (in Saccharomycetes) the intensity of fermentation usually sinks if the growth factors are eliminated one after another, this effect, however, is much less pronounced, than in regard to the energy of proliferation.

6. The microorganisms tested showed two types of response to the elimination of growth factors from the medium made in a definite sequence. One type consists in a gradual decrease of both the energy of proliferation and that of fermentation and respiration. The other type keeps fermentation and respiration at a sufficiently high level, in spite of a considerable depression of the function of proliferation.

7. The general morphology of the yeast cell, the degree of development of its microscopic structures, the character of bud-formation and accumulation of reserve substances as well as of metabolic products are to a considerable degree influenced by growth factors.

Institute of Microbiology of
the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

К МОРФОЛОГИИ ПОЛИЭДРОВ ЖЕЛТУХИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Л. М. Тарасевич

Полиэдры представляют собой включения, возникающие в ядрах клеток гусениц, больных желтухой.

Изучая в ультрамикроскопе процесс растворения полиэдров в 0,5% Na_2CO_3, Paillot et Grazia [5] наблюдали при этом внутри полиэдра множество мелких зерен. «Должно быть они занимают промежуточное положение между элементарными тельцами, образующими бесформенные агломераты, как, например, тела вакцины, и, с другой стороны, искусственно кристаллизующимися протеинами»,— пишут о полиэдрах эти авторы.

В последние годы вышли две крупные работы о полиэдрах Bergold и Schramm [3] и Glaser и Stanley [4] с противоположными выводами о природе полиэдров.

На основании своих опытов с растворами полиэдров Бергольд и Шрамм приходят к выводу, что «протеин из полиэдерных насекомых идентичен с вирусом и при этом является однородным кристаллическим продуктом вирусных молекул».

Глезер и Стенли приходят к выводу, что полиэдры являются носителями вируса, который заключен внутри полиэдра и, таким образом, защищен от всевозможных неблагоприятных воздействий.

Что касается растворимости полиэдров, то Глезер и Стенли не смогли подобрать растворитель, который не инактивировал бы их. Поэтому для изучения вируса авторы пользовались ультрацентрифугатом из крови больных червей, свободной от полиэдров. Полученный ультрацентрифугированием очищенный вирусный материал обладал полной активностью в разведении 10^{-14} г на 1 $см^3$ и имел константу седиментации $S_{20} = 17$ Svedb.

Исходя из того, что в литературе имеются противоречия почти по всем основным вопросам, касающимся природы полиэдров, или неясности, В. Л. Рыжков поставил нам ряд задач, которые сводились к следующему: необходимо было выяснить растворимость полиэдров, причину их некрасимости, причину внутренних дифференцировок, иногда возникающих в полиэдрах, возможность образования в процессе растворения полиэдров «чего-то», подобного элементарным тельцам.

Имея перед собой эти задачи, мы и приступили к работе.

Растворимость полиэдров

Мы ставили многочисленные опыты по растворению полиэдров в буферных растворах с различными pH и в 0,5% Na_2CO_3 за разные промежутки времени. Приводим один из опытов в табл. 1, показывающий среднее число полиэдров в поле зрения микроскопа после растворения их при разных pH.

Из таблицы видно, что растворение полиэдров не идет быстро и даже через 8 суток при pH = 12,3 не происходит полного растворения полиэдров.

Таким образом, следует вывод, что растворение полиэдров не идет так быстро, вопреки указанию Бергольда и Шрамма, и иногда в тече-

Таблица 1

Среднее число полиэдров в поле зрения после растворения их в буферных растворах с различными pH

Время растворения (сутки)	pH буферных растворов			
	9,3	10,4	11,3	12,3
1	400	140	7	4
8	250	40	2	4

ние нескольких суток не удается достигнуть полного растворения полиэдров.

Исходя из этого, выводы Бергольда и Шрамма относительно гомогенности растворов полиэдерного протеина мы считаем преждевременными, так как авторы употребляли растворы, в которых содержалось не все вещество полиэдров, а только более легко растворимая его часть.

Рис. 1. Полиэдры тутового шелкопряда. *a*, *b*, *c*, *d* — в различных стадиях растворения изнутри; *e* — полиэдр, разбухший в 0,5% Na_2CO_3; *f* — раздавленный и окрашенный полиэдр; *g*, *l* — полиэдры, у которых окрашена внутренняя часть (*g* из материала, хранившегося в дестиллированной воде; *i* — из 40% раствора мочевины); *h* — нативный полиэдр; *j*, *k* — окрашивание полиэдров по граням и ребрам: l_1, l_2 — полиэдры с трещинами

Наблюдая под микроскопом процесс растворения полиэдров, мы замечали, что, как правило, растворение полиэдров идет изнутри, из центра (рис. 1, *a*, *b*, *c*, *d*) и только изредка можно встретить полиэдры, растворяющиеся с периферии. Иногда полиэдры медленно разбухают и выглядят слабыми тенями (рис. 1, *e*).

Разные полиэдры ведут себя по-разному. Растворение, как правило, идет всегда из центра к периферии, т. е. изнутри. Растворение вирусных кристаллов изнутри наблюдал еще Гольдин [1] при изучении кристаллов Ивановского. Мы также наблюдали растворение изнутри линзовидных кристаллов, выделенных из сухого овса, больного закукливанием. Их растворение начинается с образования светлых полостей в центре, имеющих иногда зернистое строение.

Таким образом, возможно, что растворение изнутри является особенностью вирусных белковых кристаллов.

Этот способ растворения белковых кристаллов из овса, больного закукливанием, легко объясняется их лодочкообразной формой и тем, что в средней части кристалл более тонок, чем по краям.

Гораздо труднее объяснить причины растворения полиэдров изнутри. Это происходит, повидимому, потому, что образуются трещины в поверхностном трудно проницаемом слое, через которые растворитель проникает внутрь полиэдра. Эти трещины иногда видны под микроскопом. В тех же случаях, когда их не видно, все же, вероятно, проникновению растворителя предшествует образование тонких нежных трещин.

Красимость полиэдров

Пытаясь окрасить полиэдры обычными анилиновыми красками, мы должны были убедиться, что они не окрашиваются ими. Такое поведение полиэдров казалось нам странным, так как известно, что вирусные кристаллы хорошо красятся.

Для того чтобы выяснить, не препятствует ли окраске покрывающий полиэдры жировой слой, мы поставили следующий опыт.

Сухие мазки полиэдров на покровных стеклах выдерживались сутки в эфире, бензине, бензоле, хлороформе, ксилоле, спирте и смеси спирта с эфиром (3 : 1). Через сутки мазки окрашивались основным и кислым фуксином. Ни та, ни другая окраска не окрасила полиэдры после извлечения жиров. Следовательно, неокрашиваемость полиэдров не зависит от покрывающего их жирового слоя.

Так как полиэдры обычными красками не окрашивались и это свойство не зависело от жирового слоя на поверхности, у нас возникла мысль — не является ли механизм проникновения краски в полиэдр подобным тому, который имеется у структур с полупроницаемой оболочкой. Известно, что структуры, имеющие полупроницаемую оболочку, хорошо окрашиваются такими красками, как нейтральрот, лихтгрюн и т. п. Этими прижизненными красками мы и попытались окрасить полиэдры. Употреблялись 0,001% растворы нейтральрот и лихтгрюн. Полиэдры окрашивались в течение нескольких часов и одни сутки. Окрашивания полиэдров не произошло, что ясно указывало на иной характер проникновения краски в полиэдр, чем в протопласт.

Оставалось предположить, что проникновению краски в полиэдр мешает их периферический слой, который, повидимому, отличается от остальной части полиэдра. Большая устойчивость его к растворителям уже была показана выше.

Чтобы убедиться в этом, мы подвергли полиэдры механическому раздавливанию. Это достигалось простым нажатием пальца на покровное стекло, под которым находилась капля суспензии полиэдров. Как только полиэдр раздавливался, он начинал окрашиваться обычными анилиновыми красками. На рис. 1, *f* изображен раздавленный полиэдр, окрашенный основным фуксином. Из рисунка видно, что центральная часть полиэдра окрашивается гораздо интенсивнее периферической, которая или слабо, или совсем не окрашена.

Таким образом, простой опыт с раздавливанием полиэдров наглядно показывает нам зависимость окрашивания полиэдров от их периферического слоя, механическое повреждение которого делает полиэдр красимым. Далее было установлено, что полиэдры становятся легко окрашиваемыми, если их нагреть до 100° или фиксировать спиртовым раствором пикриновой кислоты.

Электронная микроскопия полиэдров и вопрос об элементарных тельцах в полиэдрах

Изучая процесс растворения полиэдров в 0,5% Na_2CO_3 в темном поле, Пайо и Грация наблюдали при этом возникающую внутри зернистость, которую они относили к элементарным тельцам. В разбухших от 0,5% Na_2CO_3 полиэдрах мы также наблюдали иногда неокрашивающуюся зернистость.

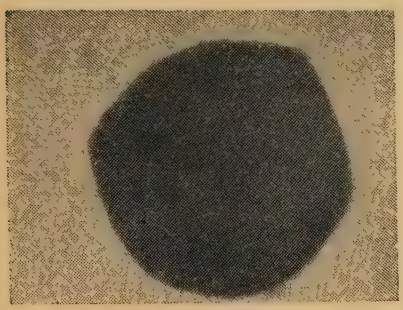


Рис. 2. Полиэдр под электронным микроскопом

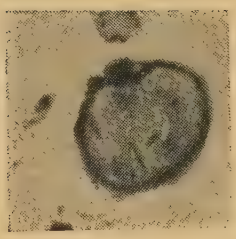


Рис. 3. Полиэдр, растворенный изнутри (под электронным микроскопом)

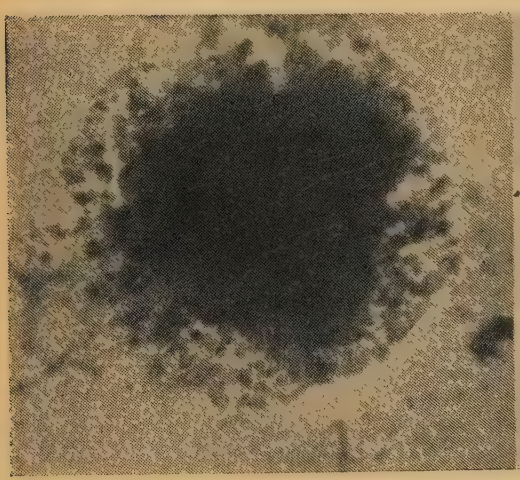


Рис. 4. Разбухший полиэдр в 0,5% Na_2CO_3 (под электронным микроскопом)

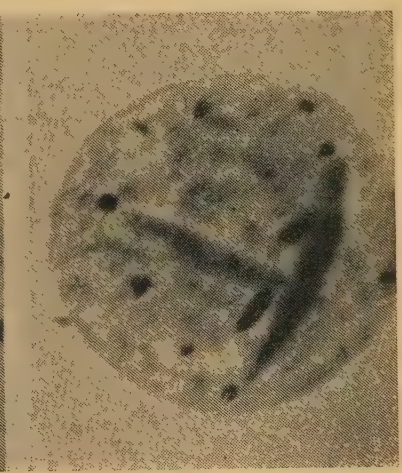


Рис. 5. Сильно разбухший полиэдр в 0,5% Na_2CO_3 (под электронным микроскопом)

Мазки полиэдров, находящиеся в процессе растворения в 0,5% Na_2CO_3, окрашивались нами по методу Морозова [2]. Отдельные окрашенные зернышки были разной величины и должны рассматриваться как неорганизованные продукты распада полиэдра.

Для окончательного суждения о наличии элементарных телец в полиэдрах был привлечен электронный микроскоп. Совместно с Б. М. Исаевым был сделан целый ряд снимков полиэдров, находящихся в процессе растворения в 0,5% Na_2CO_3. Растворяющиеся в 0,5% Na_2CO_3 полиэдры отмывались от нее многократным центрифугированием с дестиллированной водой и отмытая суспензия изучалась в электронном микроскопе. Нам удалось проследить все стадии растворения полиэдров. На рис. 2 представлен полиэдр, еще не начавший растворяться.

Рис. 3 изображает полиэдр, растворенный изнутри, с оставшейся оболочкой; в нем также не видно ничего подобного элементарным тельцам.

Случаи разбухания полиэдров и растворения с периферии также засняты под электронным микроскопом (см. рис. 4 и 5). Сравнивая эти снимки с рис. 3 и 2, можно видеть, что величина таких разбухших полиэдров приблизительно вдвое больше обычных или растворяющихся изнутри.

В периферической сильно разбухшей части видны отдельные зерна разной формы и различного размера, которые не могут быть приняты за элементарные тельца. Эти зернистости, возможно, являются результатом образования сгустков белка, образующегося при высыхании мазка, содержащего полиэдры на пленке.

Таким образом электронный микроскоп, как и специфическая для элементарных телец окраска по Морозову, не позволяют обнаружить в полиэдрах элементарных телец.

Пайо и Грация, очевидно, приняли за элементарные тельца мелкие продукты распада полиэдров, светящиеся на темном поле при ультрамикроскопировании.

Внутренние дифференцировки

Наличие дифференцировки мы наблюдали в материале, который был в нашем распоряжении в течение зимнего периода 1944 г. (отмытые в дестиллированной воде полиэдры, рис. 1, *g*).

«Изрытый» центр таких полиэдров хорошо окрашивался анилиновыми красками. Работая со свежими полиэдрами, мы убедились, что в них отсутствуют какие-либо видимые дифференцировки (рис. 1, *h*). Тогда были произведены попытки их получить. Был испытан целый ряд воздействий на полиэдры.

Так, например, 40% раствор мочевины вызывает появление дифференцировки в полиэдрах и центральная часть их делается легко красимой фуксином (рис. 1, *i*).

Кипячение полиэдров в воде в течение 10 мин. также ведет к их дифференцировке.

При действии кислот и щелочей на полиэдры последние всегда образуют внутренние дифференцировки с ясным разделением полиэдра на центральную и периферическую части.

Особенно много наблюдений мы производили с получением дифференцировок при растворении полиэдров в 0,5% Na_2CO_3. Уже через 1 час после действия на полиэдр этого раствора 80% всех полиэдров дифференцируется на центральную и периферическую части.

Возникающая в центре дифференцировка всегда распространяется параллельно граням полиэдра и, увеличиваясь в размере, направляется по его ребрам. Это можно проследить по распространению краски (см. рис. 1, *j*, *k*).

Часто можно наблюдать при разрушении полиэдров возникающие в них трещины. Они всегда проходят через центр полиэдра и направлены от ребра к ребру (рис. 1, l_1). Даже в случае срастания двух полиэдров трещины строго направлены (см. рис. 1, l_2).

Описанный характер возникновения дифференцировок говорит о наличии в полиэдрах каких-то направленных сил, подобных имеющимся в настоящих кристаллах.

Таким образом, в результате растворения или разрушения полиэдров под влиянием каких-либо условий в них всегда возникает дифференцировка на центральную и периферическую части.

В результате всех этих исследований возникла возможность вернуться к спору о гомогенности или гетерогенности полиэдра.

Разная растворимость и красимость центральной и периферической частей полиэдра говорит скорее об их гетерогенной природе.

Нам хотелось найти еще какой-либо критерий в пользу этого. Зная, что белки окрашиваются по-разному в зависимости от pH красящего раствора, мы предположили, что различные части полиэдра будут окрашиваться неодинаково при разных pH, если центральная и периферическая части отличаются по своим свойствам.

Белок перестает окрашиваться данной краской при определенном pH, которое характеризует его изоэлектрическую точку, одну из важнейших величин, определяющую основные электрохимические свойства белка и его буферность.

В качестве основной краски применялся генциан-виолет, а в качестве кислой — кислый фуксин. Однопроцентные растворы этих красок смешивались в отношении 1 : 1 с соответствующим буферным раствором. Такими красящими растворами и окрашивались мазки полиэдра, предварительно фиксированные спиртным раствором пикриновой кислоты.

Фиксированные мазки полиэдров из глицериновой суспензии и суспензии полиэдров в 30° спирту тщательно отмывались от пикриновой кислоты и окрашивались 10 мин. генциан-виолетом при pH = 8,57, а затем ополаскивались 1) 0,1 N HCl и 2) буферным раствором pH = 2,2. В обоих случаях происходило раскрашивание полиэдров и, как оказалось, оно шло неодинаково: в полиэдре сначала раскрашивалась его центральная часть. Под микроскопом можно было наблюдать полиэдры с голубым центром и темнофиолетовым периферийным кольцом.

Фиксированные мазки полиэдров из глицериновой и спиртной суспензии, тщательно отмытые от пикриновой кислоты, окрашивались 10 мин. кислым фуксином при pH = 2,2 и затем ополаскивались буферным раствором pH = 8,57. Под микроскопом и в этом случае обнаружилась дифференцированная окраска полиэдров: по периферии полиэдры оставались еще красными, а центр имел желтую окраску. Следовательно, и в этом случае происходило сначала раскрашивание центральной части полиэдров.

Такое поведение полиэдров указывает на различные электрохимические свойства центральной и периферической их частей.

Очевидно, в центре полиэдр обладает меньшей буферностью.

Возникает вопрос: как совместить возможную гетерогенность полиэдров с их кристаллическим строением? На этот вопрос должны дать ответ специалисты-кристаллографы, изучающие их кристаллические свойства.

Выводы

1. Полиэдры растворяются в буферных растворах pH = 10, 11, 12, 13 в 0,5% Na_2CO_3, CH_3COOH.

2. Растворение полиэдров в указанных растворителях происходит медленно. Так, например, при pH = 12,3—13,06 даже через 5,5 часа — 8 суток не удалось достигнуть полного их растворения.

3. Растворение полиэдра начинается или изнутри, или с периферии. Первый способ встречается чаще.

4. Полиэдры не окрашиваются анилиновыми красками обычными методами.

5. После извлечения липоидов различными растворителями (эфиром, бензином, хлороформом и т. д.) полиэдры не приобретают способности окрашиваться.

6. Полиэдры не окрашиваются также витальными красками.

7. Полиэдры начинают окрашиваться, как только механически поврежден их периферический слой, а также после фиксации полиэдров пикриновой кислотой или при температуре 100° С.

8. Распространение краски и растворителя в полиэдре идет направленно по граням и ребрам.

9. Полиэдры легко дифференцируются на центральную и периферическую части. Последняя гораздо устойчивее к растворителям, окрашиванию и фиксации.

10. Полиэдры не содержат элементарных телец, на что указывают препараты из раствора полиэдров в 0,5% Na_2CO_3, окрашенные по Морозову, и электронная микроскопия растворов полиэдров.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 15.I.1945

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдин М. И. Сб. «Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними», 1941.
2. Морозов М. А. Giorn. del Batter. ed Immun., 19, N 5, 1937.
3. Bergold G. u. Schramm G. Biol. Ctbl., Bd. 62, H. 3/4, 1942.
4. Glaser R. and Stanley W., J. Exp. Med., v. 77, N. 5, 1943.
5. Paillot A. et. Grazia A., Arch. ges. Virusforsch., Bd. 1, H. 1, 1939.

ON THE MORPHOLOGY OF THE POLYHEDRES OF MULBERRY SILK-WORM JAUNDICE

L. M. Tarassevich

Summary

1. The polyhedres can be dissolved in buffer solutions of pH=10, 11, 12, 13 of 0.5 per cent of Na_2CO_3, CH_3COOH.

2. The dissolution of the polyhedres in the solvents indicated above proceeds slowly. Thus, *e. g.* at pH=12.3—13.06 complete dissolution could not be achieved in the course of 5.5 hours — 8 days.

3. The dissolution of the polyhedres starts either from the inside or from the periphery, the first way is more common.

4. The polyhedres are not stained by aniline strains in the usual way.

5. After the extraction of lipoids with the aid of various solvents (ether, benzene, chloroform, *etc.*) the polyhedres did not acquire the ability of staining.

6. The polyhedres are not stained by vital stains either.

7. The polyhedres begin to stain only after their peripheric layer suffers some mechanical lesion or after they have been subjected to fixation by picric acid or by heat (100° C).

8. The distribution of the stains and solvents in the polyhedres is oriented by their facets and edges.

9. The polyhedre is easily differentiated into its central and peripheral parts. The latter is much more resistant to the action of solvents, to staining and fixation.

10. The polyhedres do not contain any elementary bodies, as this is shown by preparations of their solution in 0.5 per cent Na_2CO_3 stained according to the Morozov technique and by electrone microscopic observation of the solutions of the polyhedres.

Institute of Microbiology of
the Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

Б. Л. Исаченко. Микробиология в Академии Наук СССР 137

М. В. Федоров. Химизм фиксации азота атмосферы азотобактером. Влияние на продуктивность азотфиксации поверхностно-активных веществ 146

В. Н. Шапошников. О «дыхании» молочнокислых бактерий 156

Н. А. Красильников. О классификации лучистых грибков Actinomycetales 164

А. Е. Крисс, Е. А. Рукина и Б. М. Исаев. Исследования строения актиномицетов с помощью электронного микроскопа 172

А. А. Имшенецкий. Нитрифицирующие бактерии и миксобактерии 177

М. Н. Мейсель, Н. П. Трофимова и Н. П. Лисовская. Ростовые вещества и их влияние на строение и жизнедеятельность дрожжевых организмов 191

Л. М. Тарасевич. К морфологии полиэдров желтухи тутового шелкопряда 202

CONTENTS

B. L. Issatchenko. Microbiology in the Academy of Sciences of the USSR 137

M. V. Fedorov. On the chemical aspect of the fixation of atmospheric nitrogen by Azotobacter. The influence of surface-active substances on the productivity of nitrogen ixation 154

W. N. Schaposchnikov. On the «respiration» of lactic acid bacteria 156

N. A. Krassilnikov. The classification of Actinomycetales . . . 171

A. E. Kriss, E. A. Rukina and B. M. Issaiev. Electrone microscopic studies on the structure of Actinomycetes 176

A. A. Imšenecki. The nitrifying bacteria and Myxobacteria 190

M. N. Meissel, N. P. Trofimova and N. P. Lissovskaia. The growth factors and their influence on the structure and life-activity of yeast organisms 201

L. M. Tarassevich. On the morphology of the polyhedres of mulberry silk-worm jaundice 207

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

А19899 Подписано к печати 25.VI. 1945 Объем 4½ печ. л.+2 вклейки 6,75 уч-изд. л.
Тираж 2500 экз. Цена 8 руб. Зак. 365

2-я типография Издательства Академии Наук СССР, Москва, Шубинский, 10

Цена 8 руб.